

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Djillali Liabes de SIDI BEL  
ABBES Faculté des sciences de la nature et  
de la vie



Département de Biologie

**Mémoire**

Pour l'obtention de diplôme de

**Master** En Microbiologie

**Option** : Biotechnologie microbienne

**THÈME**

# **Caractisation du système CRISPR-cas chez les Klebsiella Sp**

**Présenté par :**

**BENAICHA Ishak Samir**

Discuté Le : 30/09/2020

Expertisé

Par la commission du jury composée de :

<b>Président :</b>	<b>Mr. Missouri miloud</b>	Maitre de conférences A, Université de Sidi Bel Abbés
<b>Examineur :</b>	<b>Mr. Belmokhtar Zoubir</b>	Maître de conférences A, Université de Sidi Bel Abbés
<b>Promoteur :</b>	<b>Mr. Benin Mohamed-Amine</b>	Maître de conférences A, Université de Sidi Bel Abbés

*Dedicases :*

*Je dédie cet humble travail ...*

*A ma très chère mère*

*Pour son amour, son soutien, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçoit à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A mon très cher père*

*Je te rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices, merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mon très cher frère **Nadir**, sa femme **Amína** et ses petits jumeaux : "**Tarek & Yacine**".  
A mon très cher frère **Ryad**, sa femme **Amína** et leurs petit "**Malik**" qui vas venir dans ce monde très prochainement.*

*A mon très cher petit frère **Rayan**.*

*Que ce travail vos reflète ma profonde affection.*

*Que dieu vos protège et vos procure bonheur, santé et prospérité.*

*A toute ma famille: Grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines*

*Avec toute mon affection et mon respect*

*A mes très chères Amis : **Nassim, Mustapha, Yazid, Saïd, Imad, Rania, Nassima et Ghizléne***

*En témoignage de ma gratitude et l'affection que je porte pour vous.*

*Que Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur et de santé.*

*Merci d'être présent dans ma vie.*

*A mon cher frère et ami d'enfance*

***Oussama Moumen***

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi.*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, santé et plains de réussite.*

*Merci d'être toujours là.*

***Mr. Sami Benaïcha***

# *Remerciements*

## *Merci à Dieu*

*« Je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail ».*

*Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements les plus sincères à Mr Benin M.A, maître de conférences à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.*

*Je tiens également à remercier :*

*Mr. Missouri M., maître de conférences à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mr. Belmokhtar Z., Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Je voudrais remercier Mr. Kossay Zaoui au Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) pour ses conseils durant la préparation de ce mémoire.*

*Merci .....*

## **Résumé :**

Le système procaryote CRISPR-Cas fournit une immunité adaptative contre les éléments génétiques invasifs. Les bactéries du genre *Klebsiella* sont d'importants agents pathogènes opportunistes nosocomiaux. Cependant, les informations sur le système CRISPR-Cas du *Klebsiella* restent largement inconnues.

Ici, nous avons analysé les systèmes CRISPR-Cas de 13 génomes complets de *Klebsiella* ont été extraits de la base de données génomique du NCBI, y compris 8 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *K. variicola* et 3 *K. michiganensis*, loci CRISPR dans les génomes ont été identifiés par CRISPRFinder, NCBI BLAST a été utilisé pour identifier le gène cas dans la séquence des loci CRISPR.

Tous les éléments du système CRISPR-Cas (gènes cas, DR, séquences leaders) ont été caractérisés. La présente étude vis à fournir une analyse séquentielle approfondie du système CRISPR-Cas à *Klebsiella*.

Certaines différences importantes ont été trouvées par rapport à celle d'autres pathogènes de la famille des entérobactéries. Tout d'abord, une nouvelle forme de classification des gènes cas (appelée Type I-E \*) a été trouvée. Bien que selon la méthode actuelle de classification, il devrait toujours s'agir d'un système CRISPR-Cas de type I-E car aucun gène cas distinct n'a été trouvé au-delà. Mais la récente étude indique qu'ils sont différents à bien des égards.

## **MOTS Clés :**

CRISPR-Cas, *Klebsiella*, éléments mobile, génome

## **Abstract :**

Prokaryotic CRISPR-Cas system provides adaptive immunity against invasive genetic elements. Bacteria of the genus *Klebsiella* are important nosocomial opportunistic pathogens. However, information of CRISPR-Cas system in *Klebsiella* remains largely unknown.

Here, we analyzed the CRISPR-Cas systems of 13 complete genomes of *Klebsiella* were retrieved from the NCBI genome database, including 8 *K.pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *K. variicola*, and 3 *K. michiganensis*, CRISPR loci in the genomes were identified by CRISPRFinder, NCBI BLAST was used to identify the cas gene in the sequence of the CRISPR loci.

All the elements for CRISPR-Cas system (cas genes, DR, leader sequences) were characterized. The present study aimed to provide an in-depth sequence analysis of the CRISPR-Cas system in *Klebsiella*.

Some important differences were found compared with that in other pathogens of the family of Enterobacteriaceae. First of all, a new form of cas gene arrangement (named as Type I-E\*) was found. Although according to the current method of classification, it should still be a Type I-E CRISPRCas system as no distinct cas genes were found beyond. But the present study indicated they are different in many aspects.

## **KEYWORDS**

CRISPR-Cas, *Klebsiella*, mobile elements, genome

## الملخص :

يوفر نظام كريسبر-كاس بدائية النواة مناعة تكيفية ضد العناصر الوراثية الغازية. تعد البكتيريا من جنس *كليبسيلا* من مسببات الأمراض الانتهازية في المستشفيات. ومع ذلك ، لا تزال المعلومات الخاصة بنظام CRISPR-Cas في *كليبسيلا* مجهولة إلى حد كبير.

هنا ، قمنا بتحليل أنظمة CRISPR-Cas لـ 13 جينومًا كاملاً من *Klebsiella* تم استردادها من قاعدة بيانات جينوم NCBI ، بما في ذلك 8 *K.pneumoniae* و 1 *K. oxytoca* و 1 *K. variicola* و 3 *K. michiganensis* و CRISPR loci في الجينوم تم تحديدها بواسطة CRISPRFinder ، تم استخدام NCBI BLAST لتحديد الجين *cas* في تسلسل مواقع CRISPR.

تم تمييز جميع عناصر نظام CRISPR-Cas (gènes cas, DR, séquences leaders). هدفت الدراسة الحالية إلى توفير تحليل متعمق لتسلسل نظام CRISPR-Cas في *كليبسيلا*.

تم العثور على بعض الفروق الهامة مقارنة مع تلك في مسببات الأمراض الأخرى من عائلة *Enterobacteriaceae*. بادئ ذي بدء ، تم العثور على شكل جديد من ترتيب الجينات *cas* (يسمى النوع I-E). على الرغم من أنه وفقاً لطريقة التصنيف الحالية ، يجب أن يظل نظاماً من النوع CRISPR-Cas I-E حيث لم يتم العثور على جينات *cas* متميزة. لكن الدراسة الحالية أشارت إلى اختلافهما في العديد من الجوانب.

## الكلمات المفتاحية :

الجينوم ، CRISPR-cas ، *كليبسيلا* ، عناصر متحركة.

## Liste des tableaux

---

<b>01</b>	séparation de certains membres des genres Klebsiella et Raoutellaa.b.	<b>21</b>
<b>02</b>	Les souches de Klebsiella Sp. et leur système CRISPR	<b>50</b>

## Liste des Figures

---

01	Représentation schématique d'un locus CRISPR.	<b>30</b>
02	Illustration de la provenance des séquences spacers, la séquence virale correspondant à celle des spacers serait appelée : Protospacer	<b>32</b>
03	Les différents types de CRISPR-cas	<b>33</b>
04	Architectures des locus génomiques pour les sous-types des systèmes	<b>35</b>
05	Représente un fichier fasta pour la 1 <sup>er</sup> séquence.	<b>43</b>
06	Représente le CRISPRfinder	<b>44</b>
07	Représente le CRISPRminer	<b>45</b>
08	Représente le NCBI Blast	<b>46</b>
09	Représente la liste de tout les DR	<b>47</b>
10	Représente le site : MAFFT (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences )	<b>48</b>
11	Représente le site MLST (Multilocus sequence typing) :	<b>49</b>
12	Architecture des loci et l'organisation du système CRISPR dans les gènes	<b>51</b>
13	Arbre phylogénétique des protéines Cas1 chez Klebsiella.	<b>52</b>
14	Représentation du MLST et polymorphisme :	<b>53</b>
15	Représente La distribution des espaceurs CRISPR dans les plasmides, les phages et les chromosomes on été déterminée par identité de séquence. Tous les espaceurs ont été dynamités contre la base de données GenBank pour trouver une séquence.	<b>54</b>

## Listes d'abréviations :

**Klebsiella sp.** : Klebsiella species

**CRISPR** : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

**DR** : Direct repeat

**crRNA** : crispr RNA

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**MLST** : Multilocus sequence typing

**BPO** : bactéries pathogènes opportunistes

**β-lactamines** : Bêta-lactamine

**ETB** : Entérobactérie

**EMR** : Entérobactérie multirésistante

**BMR** : Bactérie multirésistante

**BGN** : Bactérie gram positif

**ODC** : ornithine decarboxylase

**VP** : Voges-Proskauer

**ONPG** : o-nitrophenyl B-D- galactopyranoside

**NA** : Not available

# Table Des Matières

Remerciment .

Dédicace.

Résumé .

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Table des matières.

Introduction ..... 01

## Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

I. Entérobactéries..... 04

1- Définition et classification..... 04

1.2 Habitat..... 05

1.3 Caractères bactériologiques..... 05

1.3.1 Caractère culturaux..... 05

1.3.2 Caractères antigéniques..... 06

1.3.3 Pouvoir pathogène naturel..... 07

2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques..... 08

2.1. Résistance aux bêta-lactamines..... 08

2.1.1 Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »..... 08

2.1.2 Résistance acquise ou phénotypes « résistants »..... 12

2.1.3 Résistance aux autres classes d'antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatifs..... 14

2.2 Conservation des souches..... 15

2.2.1 Principes généraux..... 16

2.3 Moyens de conservation..... 17

II. LE GENRE KLEBSIELLA..... 18

1. Dénomination..... 18

2. Taxonomie..... 18

<b>3. Classification.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Habitat et épidémiologie.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Caractères bactériologiques.....</b>	<b>20</b>
5.1 Morphologie.....	20
5.2 Caractères cultureux.....	20
5.3. Caractères biochimiques.....	20
5.3.1 Caractères biochimiques de l'espèce-type de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
5.3.2 Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre <i>Klebsiella</i> .....	21
5.4 Caractères antigéniques.....	22
<b>6. Pouvoir pathogène.....</b>	<b>22</b>
6.1 Facteurs de pathogénicités.....	24
6.1.1 La capsule.....	24
6.1.2 Facteurs d'adhésion.....	24
6.1.3 Sidérophores.....	25
<b>7. Rôle de <i>Klebsiella</i> et des <i>Enterobacteriaceae</i> dans les infections nosocomiales.....</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre II : Généralités sur le CRISPR-Cas</b>	
<b>Introduction.....</b>	<b>28</b>
<b>I. Définitions.....</b>	<b>29</b>
1- CRISPR.....	29
2- CRISPRs.....	30
2-1- Répétitions et spacers (espaceurs).....	30
2-2- Une séquence leader.....	30
2-3- Groupe de gènes cas.....	31
3- Repeats and Spacers (Les espaceurs) .....	31
4- Cas Genes.....	31
5- Séquence de leader.....	32
<b>II. Les différents types de systèmes CRISPR-Cas.....</b>	<b>32</b>

<b>III. Rôle immunitaire du système CRISPR-Cas.....</b>	<b>36</b>
<b>IV. Application.....</b>	<b>38</b>
<b>Chapitre III : Méthodologie de travail</b>	
<b>I Matérielle et méthodes.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Séquences génomiques et identification de CRISPR .....</b>	<b>43</b>
<b>2. Analyse bio-informatique .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 l'obtention du fichier Fasta.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 L'identification par le CRISPRFinder.....</b>	<b>44</b>
<b>2.3 Collecte de données sur CRISPRMiner.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4. L'identification du gène cas des séquences sur NCBI BLAST.....</b>	<b>46</b>
<b>2.5. Alignement des DR's (séquences répétées).....</b>	<b>47</b>
<b>2.6. Création de l'alignement des DR's, un arbre phylogénétique.....</b>	<b>48</b>
<b>2.7. Utilisation d'approche et identification des MLST (Multilocus sequence typing).....</b>	<b>49</b>
<b>3. Discussion et résultat.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Système CRISPR.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Architecture des loci et l'organisation du système CRISPR dans les gènes.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3. Arbre phylogénétique .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4. Représentation du MLST et polymorphisme.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5. L'origine et distribution du CRISPR .....</b>	<b>54</b>
<b>4. Interprétation.....</b>	<b>54</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>57</b>
<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>59</b>

A graphic of a scroll with a black outline and a white interior. The scroll is unrolled, with the top edge slightly curved. The word "Introduction" is written in a large, bold, black, sans-serif font across the center of the scroll. The scroll has a small grey circular detail at the top right corner, suggesting a binding or a roll.

# Introduction

## Introduction

---

### Introduction :

- Entre la fin des années 1980 et le début des années 2000, quelques équipes explorant les génomes de bactéries et d'archées mettent en évidence le système immunitaire adaptatif procaryote constitué de la séquence CRISPR et des gènes associés cas. Tout d'abord comparé au système d'interférence Médie par l'ARN des eucaryotes, ce système se révèle unique et d'une complexité génétique étonnante. Par la suite, l'étude comparative des séquences CRISPR et des gènes cas, puis celle de métagénomes microbiens permettent de proposer un schéma évolutif de ces systèmes. Ces résultats rappellent l'importance de l'approche naturaliste, sans a priori, pour la compréhension du monde vivant

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas, Les répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées, est un système immunitaire adaptatif procaryote qui est représenté dans la plupart des archées et de nombreuses les bactéries. Parmi les systèmes de défense procaryotes actuellement connus(1), les loci génomiques CRISPR-Cas font preuve d'une complexité et d'une diversité sans précédent. Classification des variantes CRISPR-Cas qui capturer au maximum leurs relations évolutives est essentiel pour caractérisation génomique et fonctionnelle comparative de cet important théoriquement et pratiquement système d'immunité adaptative

- Dans cette optique nous sommes intéressés, d'une part, pour le Cas système qui s'est récemment avéré être un système d'immunité acquis contre les phages (2). Ça a été Détecté dans environ 45% des bactéries et 85% des archées Génomes (3), et d'autre part caractéristiques de l'architecture des loci cas (4), Les loci CRISPR sont généralement constitués de séquences répétées directes hautement conservées (21 à 48 pb) régulièrement séparées par des séquences d'espacement uniques (21 à 72 pb) (5). Souvent, un cluster de gènes cas est

## **Introduction**

---

présent à côté des locus CRISPR, codant pour une grande famille de protéines (6), Cette démarche expérimentale est mise en place afin de bien faire connaître la caractérisation du système CRISPR chez les *Klebsiella Sp.*, sachant qu'il devient de plus en plus le centre d'études et d'intérêt ces dernières années en bioinformatique.



# **Chapitre I :**

## **Généralités sur les entérobactéries**

### Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

#### I. Entérobactéries

##### 1- Définition et classification :

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs.

- ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6µm de long et 0,3 à 1µm de large.

- mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles

-se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire.

- acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des Pseudomonas) avec souvent production de gaz.

- ne possédant pas d'oxydase (à la différence de Vibrio et Pasteurella).

- réduisant les nitrates en nitrites.

Les Enterobacteriaceae ont un G+C% du DNA compris entre 38 et 60 mmol % (7).

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

- Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie ; ce sont :

Escherichia, Shigella.

Salmonella, Arizona, Citrobacter.

Proteus, Providencia, Morganella.

Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia

Yersinia, Edwardsiella.

- D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme ; ce sont : Buttiauxella, Cedecea, Ewingella, Kluyvera, Koserella, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Obesumbacterium, Rahnella, Tatumella, Trabulsiella, Xenorhabdus, Yokenella (8).

### 1.2 Habitat

Le nom d'entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux.

La présence des entérobactéries dans le milieu extérieur résulte pour certaines espèces bactériennes de souillures fécales (importance en hygiène alimentaire) et pour d'autres de la pollution d'origine saprophyte.

On les rencontre donc abondamment dans le tube digestif, dans les cadavres d'animaux, les fumiers et les eaux d'égout. Elles peuvent aussi être trouvées dans le sol et beaucoup moins abondamment dans les poussières ou dans l'air, et par contamination, dans les eaux d'alimentation.

On peut aussi en retrouver à la surface des téguments et des muqueuses (10).

### 1.3 Caractères bactériologiques

#### 1.3.1 Caractère culturaux

Les entérobactéries se développent bien dans un bouillon que sur une gélose ordinaire incubée 18 heures à 37°C.

- Les formes S (smooth) sont l'aspect habituel au sortie de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4mm de diamètre.

Le bouillon est trouble de façon homogène.

- les formes R (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- les colonies muqueuses sont habituelles avec les Klebsiella. Leur diamètre peut dépasser 10mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces notamment Salmonella Paratyphi B.

- les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (7).

### **1.3.2 Caractères antigéniques**

L'identification des Enterobacteriaceae se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination du sérotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques.

- les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipo-polysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.

Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

- Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutinations se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

- Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures.

Les antigènes d'adhérences ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99)

- Antigène kunin

Cet antigène commun aux Enterobacteriaceae n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique (7).

### **1.3.3 Pouvoir pathogène naturel**

Sur le plan de la pathologie humaine il convient de distinguer, comme avec les autres espèces bactériennes :

Les bactéries pathogènes spécifiques (BPS) que l'on ne retrouve pas à l'état commensal(en dehors des porteurs sains) et dont la présence dans les milieux extérieurs n'est qu'un phénomène transitoire.

Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les Salmonella, les Shigella, et les Yersinia.

Les bactéries pathogènes opportunistes (BPO).

Ces BPO peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente.

Les infections qu'elles peuvent engendrer ont pour origine :

Soit un point de départ endogène, ce qui s'explique par leur commensalité,

Soit un point de départ exogène. Il convient alors de distinguer deux aspects :

- l'un est rencontré dans l'hospitalisme infectieux où un défaut d'asepsie permettra la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade, par instrumentation ou par voie manu portée ;

- l'autre s'explique par le fait que ces bactéries de la flore digestive peuvent se retrouver, par élimination, dans la nature à l'état transitoire. Si elles n'engendrent généralement pas d'infections elles sont cependant le signe

d'une contamination fécale, voire d'un défaut d'hygiène. Ce problème est d'une importance toute particulière puisque c'est principalement de la recherche d'espèces commensales telles que *Escherichia coli*, entérocoques et *Clostridium perfringens* et de leur absence que dépend la qualité sanitaire d'une eau ou d'un produit alimentaire (10).

Les entérobactéries peuvent représenter 80% des isolats cliniquement significatifs des bacilles gram négatifs et 50% des bactéries cliniquement significatives dans les laboratoires de microbiologie clinique. Ils représentent près de 50% des cas de septicémie, plus de 70% des infections urinaires et un pourcentage significatif d'infections intestinales (11).

## **2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques**

La sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques est variable en fonction de l'espèce (résistance naturelle) et de la souche (résistance acquise).

La résistance peut toucher toutes les familles d'antibiotiques habituellement actives sur les entérobactéries. Elle résulte de quatre mécanismes : imperméabilité, efflux, modification de la cible de l'antibiotique (PLP), production d'enzyme (12).

### **2.1. Résistance aux bêta-lactamines**

#### **2.1.1 Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »**

Les entérobactéries produisent naturellement diverses bêta-lactamases ce qui permet de les classer en quatre groupes phénotypiques de résistance

Groupe 0 : phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gène de bêta-lactamase.

*Salmonella* spp et *P. mirabilis* sont dépourvus de bêta-lactamase à l'état « sauvages » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes.

Groupe 1 : phénotype « sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C

Comme les espèces précédentes. *E. coli* et *Shigella* spp sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC (groupe fonctionnel 1) qui peut entraîner, chez certaines souches, une réduction de sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux C1G.

La fréquence du phénotype « sauvage » chez *E. coli* est en moyenne de 50% en milieu hospitalier.

Groupe 2 : phénotype « pénicillinase de bas niveau »

*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A sensibles aux inhibiteurs:

- SHV-1 (groupe fonctionnel 2b) ou LEN-1 (groupe 2a) pour *K. pneumoniae*,
- Les enzymes de type OXY (groupe 2be) pour *K. oxytoca*,
- Les enzymes CKO pour *C. koseri*,
- L'enzyme CdiA (groupe 2b) pour *C. amalonaticus*,
- L'enzyme HER-1 (groupe 2b) pour *E. hermanni*

Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux uréïdopénicillines. Ce phénotype de résistance, appelé « pénicillinase de bas niveau », se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines (contrairement au phénotype « pénicillinase de haut niveau

ou pénicillinase acquise » caractérisé par l'absence de diamètre d'inhibition autour de ces disques). Les associations pénicilline- inhibiteur sont actives.

Règles de lecture interprétative : La résistance aux pénicillines et tout particulièrement aux uréidopénicillines, peut être de bas niveau. Tous les résultats « sensibles » doivent être interpréter « intermédiaires » pour ces molécules chez les espèces appartenant au groupe 2.

Groupe 3 : phénotype « céphalosporinase de bas niveau »

Les entérobactéries appartenant à ce groupe réunissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C (AmpC, groupe fonctionnel 1) chromosomiques et inductibles par les Bêta-lactamines (molécules fortement inductrices : céfoxitine, imipénème, clavulanate). Ces céphalosporinases sont très répandues chez les entérobactéries isolées en bactériologie clinique : *Enterobacter cloacae*,

*Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* (et les autres espèces de ce genre), *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* et *Pantoea agglomerans*.

Le phénotype « sauvage » de ces espèces, souvent appelé « céphalosporinase de bas niveau » comprend une résistance aux aminopénicillines, à leurs associations aux Bêta-lactamines inhibitrices et aux C1G. Le comportement vis-à-vis des C2G et des céphamycines permet de répartir les espèces en 3 sous-groupes : (i) les espèces sensibles au céfuroxime (C2G) et à la céfoxitine (céphamycine) : *H. alvei*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. agglomerans* ; (ii) les espèces plus résistantes à la céfoxitine qu'au céfuroxime : *E. cloacae*, *E. aerogenes* et *C. freundii* ; (iii) les espèces plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *S. marcescens* et *M. morganii*.

La fréquence du phénotype « sauvage » est variable selon l'espèce et la situation épidémiologique du moment où du lieu considéré. Le phénotype

sauvage est cependant plus fréquent chez les espèces *H. alvei*, *P. rettgeri*, *Providencia* spp et *M. morgani* (65 à 85%) que chez *C. freundii*, *E. cloacae* et *E. aerogenes* (38 à 65%).

Les espèces *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* appartenait initialement à ce groupe. Pour des raisons phénotypiques et moléculaires, il est plus cohérent de les inclure dans un nouveau groupe 5 correspondant au phénotype « céfuroximase ».

#### Groupe 4 : phénotype Céphalosporinase inductible

*Y. enterocolitica* et *S. fonticola* produisent naturellement une céphalosporinase inductible de classe C (groupe fonctionnel 1) et une enzyme de classe A. Chez *Y. enterocolitica*, ce dernier est une pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau (groupe fonctionnel 2b). Chez *S. fonticola*, l'enzyme de classe A est une bêta-lactamase inductible de la classe 2be (SFO-1 et apparentées).

*Y. enterocolitica* est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux C1G. La résistance aux uréidopénicillines n'apparaît pas in vitro. Le phénotype de résistance de *S. fonticola* est similaire. Cependant, le céfuroxime n'est pas actif et la résistance à l'association aminopénicilline- bêta-lactamine inhibitrice, qui devrait normalement être induite par l'enzyme AmpC, ne s'exprime pas ou à très bas niveau in vitro

#### Groupe 5 : phénotype « céfuroximase »

*P. vulgaris* et *P. penneri* produisent naturellement une céphalosporinase de classe A inductible par les bêta-lactamines souvent appelée céfuroximase (groupe fonctionnel 2e). Le phénotype se caractérise par une résistance aux aminopénicillines, aux C1G, aux C2G (céfuroxime, céfamandole) à l'exception

des céphamycines (céfoxitine) et une sensibilité aux associations pénicillines-bêta-lactamines inhibitrices.

Groupe 6 : phénotype « Bêta-lactamase à spectre étendu chromosomique »

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des bêta-lactamases à spectre étendu de classe A (groupe 2be). Ces BLSE souvent exprimées à bas niveau confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception de céphamycines. La résistance aux uréïdopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensibles » en « intermédiaire » pour les pénicillines, de même pour les C3G si le test de synergie est positif (12).

### **2.1.2 Résistance acquise ou phénotypes « résistants »**

A la résistance naturelle aux bêta-lactamines peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. La résistance acquise par production de bêta-lactamase est le mécanisme prépondérant. Cependant, la fréquence des autres mécanismes de résistance, souvent exprimés à bas niveau, pourrait être sous-estimée faute d'études épidémiologiques.

Phénotype « pénicillinase de haut niveau » ou « pénicillinase acquise »

Le phénotype « pénicillinase de haut niveau » est d'expression variable selon la nature du promoteur du gène de structure, du nombre de copies du gène et de l'espèce bactérienne hôte. L'expression est souvent faible chez *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani* et *Providencia*. Le phénotype de résistance se présente donc sous différentes formes qui évoluent entre deux extrêmes :

Une activité pénicillinase faible responsable d'une résistance limitée aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 2) et aux carboxypénicillines. La sensibilité aux uréïdopénicillines et C1G apparaît peu ou pas affectée.

Une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs, aux carboxypénicillines, aux uréïdopénicillines et aux C1G. Une diminution de la sensibilité est communément observée pour les associations ticarcilline-clavulanate et pipéracilline-tazobactam. La résistance peut s'étendre aux C2G, principalement chez *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp et *C. freundii*.

Règles d'interprétation : En raison des enzymes impliquées dans ce phénotype, il est recommandé d'interpréter les résultats « sensibles » en « intermédiaires » pour toutes les pénicillines si la production d'une pénicillinase est suspectée.

Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »

Le phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs » a été initialement décrit chez *E. coli* en 1991. Il comporte une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et à moindre niveau aux uréïdopénicillines, comme dans le phénotype précédent. Cependant il s'en distingue par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les bêta-lactamines inhibitrices alors que les C1G conservent généralement leur efficacité.

Phénotype « beta-lactamase à spectre étendu »

Le phénotype « beta-lactamase à spectre étendu » (BLSE) comprend une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines, à l'exception des céphamycines. Cependant, la résistance aux C3G, C4G et à l'aztréonam est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches.

Phénotype « hyperOXY »

Des souches de *K. oxytoca* sont résistantes à haut niveau à l'ensemble des pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'exception des céphamycines, et à bas ou haut niveau à l'aztréonam. Le test de synergie avec le clavulanate est positif avec le céfotaxime, rarement positif avec les C4G et la ceftazidime. Le niveau de résistance, toujours plus élevé pour l'aztréonam que pour les C3G et les C4G, permet de différencier le phénotype « hyperoxy » du phénotype « BLSE »

Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »

Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'aztréonam et à au moins une C3G. Le test de synergie est négatif entre les C3G, les C4G ou l'aztréonam et les bêta-lactamines inhibitrices. Les céphamycines ne sont pas actives, exception faite vis-à-vis de l'espèce *H. alvei* et les C4G restent le plus souvent efficaces. La résistance aux C3G peut être totalement ou partiellement restaurée en présence de cloxacilline (100mg/l).

### **2.1.3 Résistance aux autres classes d'antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatifs**

Les entérobactéries habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines sont habituellement sensibles aux phenicoles, tétracyclines, sulfamides, triméthoprime, nitrofuranes, fosfomycine et polymyxine (colistine). Mais cependant la plupart des espèces de *proteus*, *morganella*, *providencia* et *serratia* sont résistantes aux tétracyclines, nitrofuranes et polymyxine. Enfin la rifampicine n'est active que sur certaines espèces d'entérobactéries. En plus de la résistance naturelle, les entérobactéries peuvent devenir résistantes (résistance acquise) à un ou plusieurs de ces antibiotiques ou antibactériens par mutations chromosomiques ou acquisition de plasmides de résistance (10).

Enfin un critère de gravité particulier est représenté par le fait que ces souches d'entérobactéries présentent souvent des résistances multiples aux antibiotiques. Un nombre croissant de souches, en particulier dans le genre *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* et *Providencia*, quelques souches de *Proteus* indole-positif et des souches d'*Escherichia coli* cephalotine résistance, possèdent des bêta-lactamases qui augmentent le phénomène de résistance à de nombreux antibiotiques du groupe des bêta-lactamases. L'émergence et l'augmentation potentielle de souches d'entérobactéries productrices de BLSE (bêta-lactamases à spectre élargi) en particulier chez *K. pneumoniae* constituent un phénomène inquiétant. La détection de ces souches n'est pas seulement importante pour le patient mais également dans le cadre de la surveillance des infections nosocomiales (13).

## **2.2 Conservation des souches**

Tout bactériologiste est confronté au problème de conservation des souches bactériennes particulièrement en Afrique où les conditions ne sont toujours pas réunies. Les motifs de conservation sont variés, parmi lesquels :

- Etude des gènes de résistance et de leur mécanisme ;
- Envoi de souches pour études plus approfondies (sérotypage, lysotypage, étude de virulence...) par un laboratoire de référence ;
- Etudes ultérieures de similitudes pour des souches isolées chez un même malade ou chez des malades différents (enquêtes épidémiologiques, mises en évidence d'infections nosocomiales...)
- Souches de référence utiles pour l'identification de souches inconnues, les études taxonomiques, l'enseignement ou la validation de techniques (antibiogramme, dosage de vitamines...). Ces souches proviennent généralement de centres spécialisés (collections) ;

- Souches à usage industriel : production de vaccins, d'antibiotiques, d'enzymes, de dérivés laitiers et agro-alimentaire (fermentations) ;
- Souches mutantes ayant des propriétés particulières.

### **2.2.1 Principes généraux**

Si le but est de maintenir le plus longtemps possible sans repiquage, la vitalité d'une population bactérienne, il est également souhaitable que le phénotype et le génotype de la souche soient conservés.

Il convient dans tous les cas d'éviter :

- Tout stress pouvant entraîner la mort ou la dégénérescence des bactéries. Une température de conservation constante et la plus basse possible est donc recommandée, de même que le maintien à l'obscurité.

- L'apparition de mutants : des repiquages répétés, particulièrement en milieu liquide, sont déconseillés et tout repiquage se fera par prélèvement de colonies ;

- La perte de virulence : repiquages limités entre deux passages sur animal et dans certains cas, conservation des organes, voire de l'animal entier inoculé, par congélation.

La conservation de bactéries nécessite de les placer en état de vie ralentie ou momentanément suspendue (spores), donc dans des conditions peu favorables à leur multiplication. Les états secs ou congelés seront privilégiés et dans le cas de repiquages sur milieux de cultures, ceux-ci seront pauvres, exempts de sucres fermentescibles, à l'abri de l'action de l'oxygène de l'air (tube hermétique ou culture recouverte d'huile minérale).

D'une façon générale, la culture bactérienne sera en tout début de phase stationnaire afin de privilégier la conservation de cellules bactériennes matures, plus résistantes aux agressions liées aux diverses méthodes de conservation.

**2.3 Moyens de conservation**

- Conservation de courte durée (quelques jours à quelques semaines)

Au laboratoire : c'est dans ce délai qu'une conservation sur milieux de culture est envisageable sans être trop fastidieuse. L'intervalle entre deux repiquages sera fonction de la bactérie (variable selon le genre, l'espèce, voire au sein d'une même espèce), du milieu employé et des conditions ambiantes. Quelques règles générales : le milieu de culture choisi est incubé (18 à 24 heures à la température optimale de la souche), puis conservé à la température du laboratoire ou du réfrigérateur à 4°C. Les cultures seront conservées à l'obscurité, tubes hermétiquement bouchés, pour éviter la dessiccation et limiter l'action de l'oxygène de l'air. Dans ce dernier but, la culture incubée peut être recouverte d'huile minérale stérile ou scellée sous vide (bactéries anaérobies). Pour des bactéries peu fragiles (entérobactéries, staphylocoques, corynébactéries, Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter...), il n'y a pas de problème particuliers de conservation pendant quelques semaines à 22°C.

Pour expédition : il existe dans le commerce des milieux de transports très utiles pour l'expédition de souches bactériennes y compris des bactéries très délicates mais dont il convient de s'assurer de la capacité à maintenir en survie la bactérie considérée. Pour des bactéries de culture difficile et nécessitant une atmosphère particulière (anaérobiose ou microaérophilie), on préférera l'expédition de la culture bactérienne dans des géloses profondes ou dans des sachets préservant cette atmosphère.

- Conservation de moyenne durée (quelques mois)

Les repiquages deviennent alors fastidieux et sont sources de mutations possibles. La multiplication cellulaire implique un métabolisme bactérien actif, ce qui augmente les risques de mutations ou d'altérations des caractéristiques (ferments). Les bactéries devront donc présenter un maximum de stabilité. On

pourra cependant pour ce délai de conservation des milieux spéciaux adaptés ou la congélation à -80°C.

- Conservation de longue durée (plusieurs années)

Pour cette durée de conservation un maximum de garanties quant à la viabilité des échantillons sera recherché. Pour certaines bactéries, une simple dessiccation pourra suffire à maintenir un état de survie très long, mais pour la plus grande majorité des autres des méthodes plus sophistiquées comme la lyophilisation ou la congélation en azote liquide seront mises en oeuvre (14).

## **II. LE GENRE KLEBSIELLA**

### **1. Dénomination :**

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs Edwin, 1877 et l'espèce type dénommée « pneumo bacille » par Friedlander qui l'a décrit comme agent des pneumonies mortelles pendant la période de 1882 à 1884 (15).

### **2. Taxonomie :**

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe Gamma : Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

### **3. Classification :**

On distingue plusieurs espèces :

*Klebsiella pneumoniae* (espèce type)

*Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*

*Klebsiella oxytoca*

*Klebsiella ornitholytica*

*Klebsiella planticola*

*Klebsiella terrigena*. (16)

*Klebsiella granulomatis*

*Klebsiella variicola*

*Klebsiella singaporensis*

Dans le genre *Klebsiella*, un groupe de souches fixatrice d'azote isolées des plantes (banane, riz, canne à sucre et maïs) et des échantillons cliniques humains, principalement du sang, ont été nommés *K. variicola*.

Une deuxième nouvelle espèce, *K. singaporensis*, a été proposée pour une seule souche isolée du sol prélevée sur les racines de canne à sucre à Singapour (17).

#### **4. Habitat et épidémiologie:**

Les *Klebsiella* sont très répandus dans la nature. On les trouve dans l'eau, le sol et la poussière. Ce sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme, on peut les retrouver dans l'oropharynx.

Le portage digestif de *Klebsiella* est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale. Sur les mains du personnel et sur les objets de l'environnement dans les services hospitaliers, la présence de *Klebsiella* est très fréquente.

La transmission des *Klebsiella* d'un malade à un autre est habituellement manuelle.

Les épidémies hospitalières dues à des souches multi résistantes peuvent être observées (8).

**5. Caractères bactériologiques****5.1 Morphologie**

Les Klebsiella sont des gros bacilles à Gram négatif immobiles, entourés d'une capsule, qui appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Les membres de la famille des Enterobacteriaceae sont des bactéries Gram négatifs, des anaérobies facultatifs, en forme de bâtonnet ou coccobacille et leur taille varie de 0,3 à 1,0  $\mu\text{m}$  de largeur et de 0,6 à 6,0  $\mu\text{m}$  de longueur. Les espèces du genre Klebsiella forment souvent des colonies mucoïdes (17).

**5.2 Caractères cultureux**

Sur milieux usuels, les Klebsiella donnent après une incubation de 24 heures à 37°C des colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses, ayant une tendance à la confluence.

Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse, est parfois observée avec d'autres Enterobacteriaceae notamment certaines souches de E. coli (7).

**5.3. Caractères biochimiques****5.3.1 Caractères biochimiques de l'espèce-type de Klebsiella pneumoniae :**

- Fermentation des sucres : glucose+
- Métabolisme du tryptophane en indole : indole -
- ONPG +
- Production du gaz (+)
- Mobilité (-)
- VP (+)
- TDA (-)
- H<sub>2</sub>S (-)
- ODC (-)

- ADH (-)
- LDC (+)
- Citrate de Simmons (+) (18)
- Urease (+)

**5.3.2 Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre Klebsiella :**

Klebsiella oxytoca se distingue de Klebsiella pneumoniae par la production d'indole.

Klebsiella ozaenae est VP (-), ONPG (+) et malonate (-),

K. rhinoscleromatis est VP (-), ONPG (-) et LDC(-).

**Tableau I:** séparation de certains membres des genres Klebsiella et Raoutellaa.b. (17).

Espèces	Indole	ODC	vp	Malonate	ONP G	Growth at		Acide from D-melezitose
R. ornitholitica	+	+	V	+	+	+	NA	NA
K. oxytoca	+	-	+	+	+	-	+	-
K. ozaenae	-	-	-	-	V	NA	NA	NA
K. pneumonia	-	-	+	+	+	-		-
R. planticola	V	-	+	+	+	+	-	-
R. terrigena	-	-	+	+	+	+	-	+
K. rhinoscleromatis	-	-	-	+	-	NA	NA	NA

aK. singaporensis biochimiques ne sont pas disponibles; Seule une seule souche est connue.

Abréviation et symboles : ODC, ornithine decarboxylase ; VP, Voges-Proskauer ; ONPG, o-nitrophenyl B-D- galactopyranoside ; NA, Not available; +,V,11 à 89% ; -, < 10%

dK. variicola est retiré de K. pneumoniae par la réaction négative d'adonitol ; Certaines souches sont également négatives à L-Rhamnose.

#### **5.4 Caractères antigéniques :**

Les Klebsielles possèdent des antigènes O (somatiques) et K (capsulaires).

La recherche des antigènes présente peu d'intérêt pratique, en raison de leur nombre réduit (13 antigènes O différents) et de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires K. La recherche des antigènes K est indispensable à toute enquête épidémiologique. Ils sont recherchés par agglutination sur lame ou en tubes, ou encore par la réaction de Neufeld dite du « gonflement » de la capsule (opacification de la capsule résultant d'une réaction antigène-anticorps). Le typage antigénique capsulaire peut aussi être effectué par immunofluorescence indirecte à pH9, par immunoélectrophorèse à contre-courant, par Co-agglutination de la souche de Cowan de Staphylococcus aureus enrobée d'anticorps anti capsulaire, par agglutination de particules de latex sensibilisées.

Il existe 77 types capsulaires, soit K1 à K72, K74, K79 à 82. Klebsiella pneumoniae et Klebsiella oxytoca se distribuent selon un grand nombre de type capsulaire.

Klebsiella ozaenae appartient généralement au type 4, plus rarement aux types 1, 5, 6, 22. Klebsiella rhinosleromatis uniquement au type 3.

Il existe des communautés antigéniques K entre Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli et d'autres entérobactéries quand elles sont capsulées (19).

#### **6. Pouvoir pathogène**

Klebsiella pneumoniae est un agent classique et majeur d'infection nosocomiale en général et néonatale particulièrement (20).

Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires (IU) soit 6 à 17%.

Elle fait partie du groupe KES (Klebsiella, Enterobacter, Serratia) qui est d'une grande importance en clinique hospitalière (21).

Les espèces de *Klebsiella pneumoniae* sont à l'origine d'infection survenant dans les unités de soin intensif (USI).

*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosante, les abcès pulmonaires et les pleurésies purulentes.

Elle est également responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies, de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales.

Chez l'homme cette espèce est isolée des selles chez 30% des individus et est isolée dans certaines circonstances pathologiques communautaires et nosocomiales (22).

*Klebsiella pneumoniae* subsp *ozoenae* : Provoque l'ozène, une rhinite atrophique primaire caractérisée par une inflammation chronique du nez.

*K. pneumoniae* subsp. *ozoenae* a été également isolée à partir de surinfections de bronchite chronique, de bactériémies, de méningites, d'abcès cérébraux d'otites, de mastoïdites, d'infections urinaires, de surinfections de plaies et d'ulcères de la cornée (23).

*Klebsiella pneumoniae* subsp *rhinoscléromatis* : provoque le rhinosclérome, une infection granulomateuse chronique des voies respiratoires supérieures (cavité nasale) (24).

*Klebsiella planticola* représenterait 8-19% des isolats cliniques de *klebsiella* associés à différentes situations cliniques dont les septicémies.

Cette espèce est responsable de la colonisation néonatale.

*Klebsiella terrigena* représenterait 0,4% des isolats cliniques et a été isolée à partir de prélèvements broncho-pulmonaires, de plaies et d'urines.

Sa signification pathologique reste à préciser.

*Klebsiella granulomatis* provoque la donovance ou granuloma inguinale.

Cette affection cosmopolite, le plus souvent vénérienne, a été décrite en Inde par McLeod en 1882 (22).

*Klebsiella oxytoca* : Ces *Klebsiella* sont une cause de méningites et d'abcès cérébral d'origine communautaire (25).

### **6.1 Facteurs de pathogénicités :**

#### **6.1.1 La capsule:**

Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène k (26).

#### **6.1.2 Facteurs d'adhésion :**

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ils sont formés de différentes sous unités.

Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (27).

- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des

supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (28).

### **6.1.3 Sidérophores**

C'est la possibilité des bactéries à capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication in vivo des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (21).

## **7. Rôle de *Klebsiella* et des *Enterobacteriaceae* dans les infections nosocomiales**

Les infections nosocomiales représentent un véritable problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique. Leur surveillance est devenue, au cours de ces dernières décennies, un élément essentiel de tout programme de lutte contre ces infections (29).

Elles constituent une situation préoccupante du fait de leur morbidité et mortalité élevées et surtout de l'émergence des souches multi résistantes (BMR) (30).

Les infections bactériennes constituent une part importante. Leur diffusion signe toujours une hygiène hospitalière insuffisante. Le manu portage par les

personnels soignants, des infections urinaires sur sonde, des pneumopathies et les infections de site opératoire, le manque d'asepsie lors de gestes invasifs et une stérilisation insuffisante des matériels sont les déterminants majeurs des IN bactériennes, notamment multi résistantes.

L'infection urinaire occupe la troisième place des infections acquises en USI (17,6%) derrière les pneumopathies (46,9%) et les infections respiratoires basses (17,8%). D'après le National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), 0,9% des infections nosocomiales sont en relation avec le décès du patient (31).

Les nouveau-nés sont soumis au risque nosocomial en maternité (3% d'infections), en néonatalogie (7,5 à 12,7%) et en réanimation (14,2%).

Dans 18 % des septicémies néonatales, les responsables sont des germes gram négatif : *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia coli*. Ces mêmes bacilles sont responsables de 55 % des pneumopathies (32).

*Klebsiella pneumoniae* a été associée à 2%-5% des infections nosocomiales, en particuliers celles impliquant les voies respiratoires et urinaires inférieures (33).

*Klebsiella pneumoniae* est l'un des agents pathogènes hospitaliers les plus importants, notamment en ce qui concerne la souche ESBL + souche multi drogue

Des études internationales de surveillance ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *K. pneumoniae*. En effet, la prévalence mondiale des *K. pneumoniae* BLSE, entre 2005 et 2007 est passée de 19,2 à 30 % selon le programme Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) (34).



**Chapitre II :**  
**Généralités sur le CRISPR-Cas**

### Chapitre II : Généralités sur le CRISPR-Cas

#### Introduction :

La découverte du système CRISPR, est un mélange de hasard, de curiosité scientifique et de volonté d'innovation. Elle est le fruit de la convergence entre des travaux ayant pour objectif l'édition génomique et des recherches plus exploratoires dont le but était de percer les mystères d'une étrange structure génomique présente dans la nature. Les humains ont voulu modifier la vie depuis des milliers d'années. Ils l'ont d'abord fait par reproduction sélective dans le but de renforcer certains traits de plantes et d'animaux. Mais nous n'avons que récemment compris les mécanismes moléculaires de ces modifications. Cette compréhension a débuté par l'élucidation des mécanismes de l'hérédité avec les travaux de Mendel et Morgan (35), puis il y a environ 60 ans elle s'est poursuivie avec la découverte de la structure en double hélice de l'ADN (36). En identifiant les éléments de base du code génétique, nous avons eu accès à une étude plus poussée du vivant. La génétique est devenue un nouveau champ d'étude, au début des années 1960s les scientifiques bombardaient des plantes avec des radiations dans l'espoir de causer des mutations aléatoires dans le code génétique et d'étudier leur impact. Puis au fur et à mesure les méthodes et les outils à disposition sont devenus plus précis. À la fin des années 1970s les premiers séquençages génétiques apparaissaient. L'avancée et l'accessibilité de ces techniques de séquençages (37,38) permit peu à peu la réalisation de bases de données regroupant une grande partie des génomes de nombreux organismes, incluant l'homme. En parallèle l'utilisation et la découverte d'enzymes (ligases, polymérases et enzymes de restrictions) et de la PCR (Polymerase Chain Reaction)(39) ont permis d'isoler les gènes et d'y introduire des mutations, que ce soit *in vitro* au sein des cellules, ou chez des modèles animaux. Grâce à ces techniques, la

compréhension des mécanismes génétiques s'est approfondie et le génie génétique s'est développé. Le système CRISPR et plus particulièrement le système CRISPR-Cas9 représente aujourd'hui l'outil le plus simple d'utilisation en génie génétique et il promet d'être l'un des plus spécifiques.

*« Aujourd'hui l'édition génomique ressemble à une découpe au scalpel, dans les années 1960s par comparaison, ils tapaient sur les gènes à coups de marteau » (40).*

### **I. Définitions :**

#### **1- CRISPR :**

Se sont des Séquences répétées trouvées dans l'ADN de nombreuses bactéries et archaea. Le nom est l'acronyme de: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

Les Spacers ou DR, dont la taille varie de 23 à 47 paires de bases, sont séparées par des entretoises de longueur similaire. Les répétitions montrent souvent une certaine symétrie de dyade mais ne sont pas vraiment palindromiques. Les espaceurs (Spacers) sont généralement uniques dans un génome. Ils correspondent à des séquences dans les génomes de phages, de plasmides ou d'éléments génétiques mobiles. À l'intérieur d'une espèce, le tableau de répétition CRISPR peut montrer du polymorphisme.



**2.3. Groupe de gènes cas :** Les gènes associés à CRISPR sont des gènes étroitement liés aux séquences répétitives.

### **3- Repeats and Spacers (Les espaceurs) :**

Dans une souche donnée, plusieurs CRISPRs peuvent être trouvés avec une séquence répétée unique ou différente, mais un seul de chaque type est associé aux gènes cas. Les espaceurs des différents CRISPRs sont différents.

Les séquences ou espaceurs uniques correspondent principalement à des fragments d'ADN étranger, c.-à-d. virus, plasmides ou éléments génétiques mobiles.

### **4- Cas Genes:**

Plusieurs gènes appelés cas pour CRISPR-associés sont trouvés dans le voisinage des CRISPRs et effectuent les trois différentes fonctions du système immunitaire : l'adaptation, crRNA maturation et l'interférence. Leur nombre varie d'un type à l'autre. Les études phylogénétiques effectuées sur la protéine CAS suggèrent que les CRISPRs sont acquis par transfert horizontal. Cela est également démontré par leur présence sur les méga plasmides.

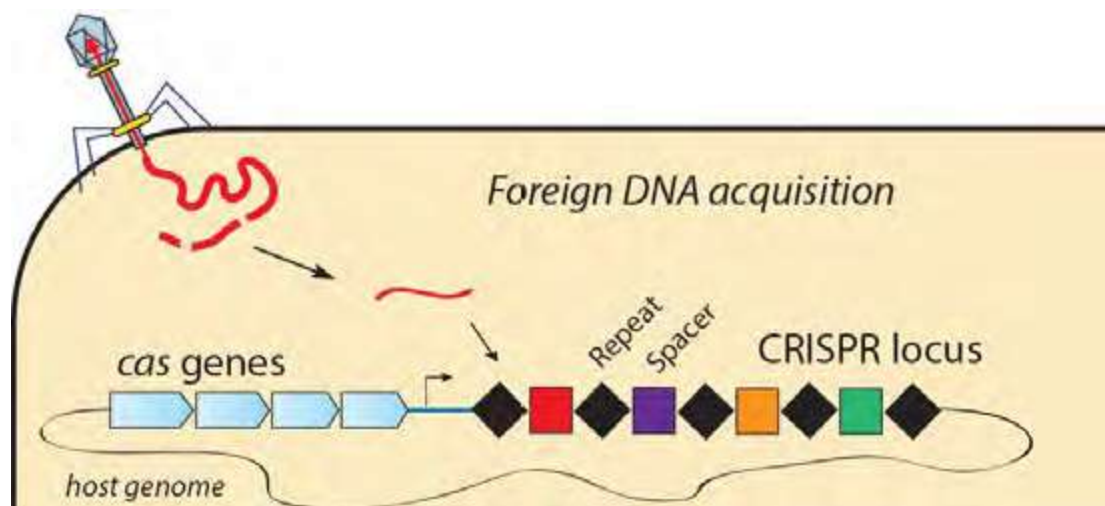
Initialement ils identifiaient quatre gènes (Cas 1 à 4), un gène qu'ils nommèrent Cas1 était toujours associé aux CRISPRs. L'étude des séquences des gènes Cas montra qu'ils codaient probablement pour des domaines hélicases et nucléases 38–40. La protéine codée par le gène cas3 montrait des motifs caractéristiques des hélicases de la superfamille 2, tandis que la protéine Cas4 comportait des motifs de la famille RecB des exo-nucléases (des domaines destinés à délier et à couper les acides nucléiques).

Ces observations suggéraient que les protéines codées pouvaient être impliquées dans le métabolisme de l'ADN ou l'expression génique. La proximité géographique des séquences Cas avec les séquences CRISPR et la nature de

leur produit amena à penser qu'il existait un lien entre les deux. Ils constitueraient le système CRISPR-Cas.

### 5- Séquence de leader

Les loci de CRISPR sont transcrits dans un pré-ARNr du leader agissant en tant que promoteur. Ce précurseur est ensuite transformé en un petit ARNr qui joue un rôle dans le ciblage et la destruction de séquences étrangères homologues.

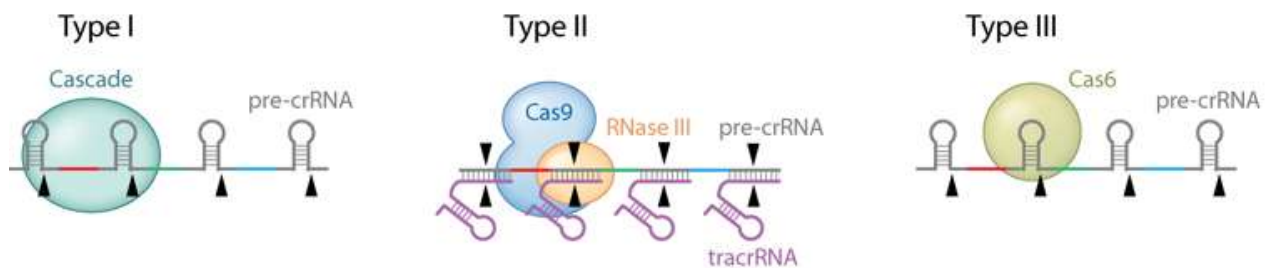


**Figure N°02.** Illustration de la provenance des séquences spacers, la séquence virale correspondant à celle des spacers serait appelée : Protospacer

## II. Les différents types de systèmes CRISPR-Cas

Il existe 3 types principaux\* de systèmes CRISPR-Cas de l'immunité adaptative qui diffèrent par :

- les répertoires de gènes associés aux CRISPR ("répertoires of cas genes")
- l'organisation des opérons cas
- la structure des répétitions au sein des matrices CRISPR

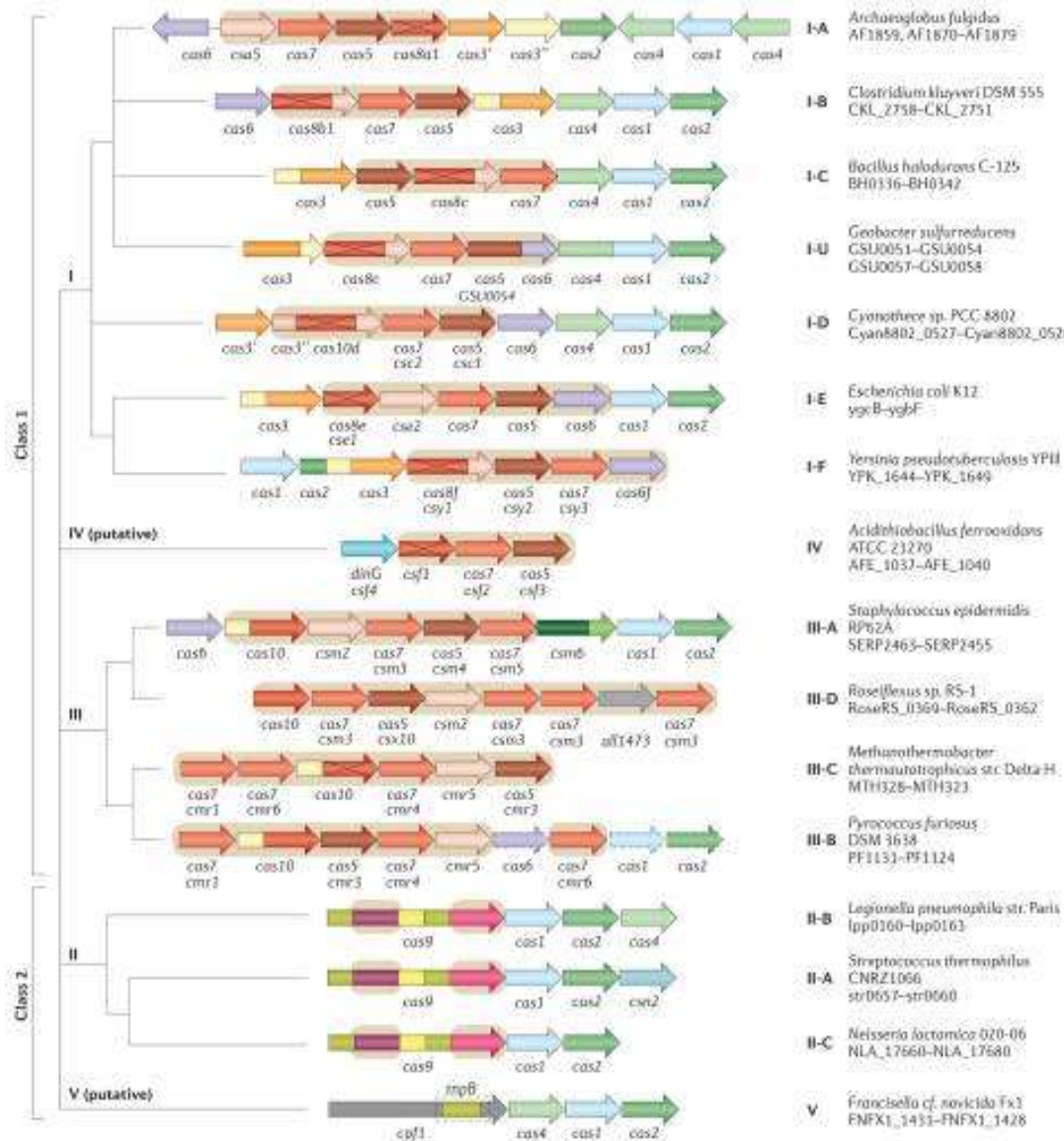


**Figure N°3.** Les différents types de CRISPR-cas

-Les analyses bioinformatiques révèlent l'existence de systèmes CRISPR de type IV et de type V. On distingue donc :

- la classe I (types I, III et IV) : systèmes CRISPR qui utilisent un module effecteur crRNA multimérique
  - la classe II (types II et V) : systèmes CRISPR qui utilisent un module effecteur crRNA monomérique
- Les systèmes CRISPR-Cas de types I utilisent des complexes multi-protéiques pour le ciblage guidé par le crRNA.
- Endo-ribonucléases de la famille Cas6 : clivage du pre-crRNA et biogenèse des crRNA des systèmes de types **I-A, I-B, I-D, I-E et I-F**
  - Endo-ribonucléase Cas5d : clivage du pre-crRNA et biogenèse des crRNA des systèmes de type I-C
  - Chez *Escherichia coli*, les crRNAs sont incorporés dans un complexe multimérique appelée Cascade ("CRISPR-associated complex for antiviral defense" - complexe associé à CRISPR pour la défense antivirale), système CRISPR-Cas de type I-E nécessaire pour la protection contre les bactériophages.

- Les systèmes CRISPR-Cas de types II sont plus simples : un petit ARN agissant en trans appelé tracrRNA ("trans-acting small RNA") s'apparie avec chaque répétition du pre-crRNA pour former un ARN double brin [tracrRNA:crRNA] clivé par la RNase III en présence de l'endonucléase Cas9. Ils génèrent des cassures double brin dans l'ADN invasif.
- Les systèmes de types III sont les plus complexes. Ces loci contiennent des gènes codant des protéines Cas10 et des modules Csm (pour le type III-A ) ou Cmr (pour le type III-B) qui forment ensemble les complexes de ciblage [Cas10-Csm] ou [Cas10-Cmr].
  - Comme dans les systèmes de types I, le clivage du pre-crRNA est réalisée par Cas6. Cependant, l'endonucléase Cas6 ne fait pas partie du complexe Cas10.
  - Les systèmes de types III ont deux caractéristiques : la transcription de la cible est nécessaire pour l'immunité et les deux cibles d'ADN sont clivées.



**Figure N°4.** Architectures des locus génomiques pour les sous-types des systèmes

Une organisation typique d'opéron est montrée pour chaque CRISPR-cas système sous-type. Pour chaque génome représentatif, les noms de locus respectifs sont indiqués pour chaque sous-unité. Les gènes homologues sont codés par couleur et identifiés par un nom de famille. Les noms de gènes suivent la classification. Lorsqu'un nom systématique et un nom patrimonial sont couramment utilisés, le nom patrimonial est donné sous le nom systématique. La petite sous-unité est codée par csm2, cmr5, cse2 ou csa5;

aucun nom englobant n'a été proposé pour décrire collectivement cette famille de gènes à ce jour. Les croisements à travers les gènes codant pour la grande sous-unité (membres de la famille Cas8 ou Cas10) indiquent l'inactivation des sites catalytiques respectifs. Les gènes et les régions de gènes codant les composants du module d'interférence (ARN CRISPR (crRNA)-complexes effecteurs ou protéines Cas9) sont mis en évidence avec un fond beige. Le module d'adaptation (cas1 et cas2) et cas6 sont dispensables dans les sous-types III-A et III-B ; en particulier, ils sont rarement présents dans les sous-types III-B (lignes pointillées). Le vert foncé désigne le domaine CARF. Les régions géniques de couleur crème représentent le domaine de la nucléase HD; le domaine HD de Cas10 est distinct de celui de Cas3 et Cas3. Sont également colorées les régions de cas9 qui correspondent approximativement à la nucléase de type RuvC (vert lime), à la nucléase de HNH (jaune), au lobe de reconnaissance (violet) et au motif adjacent du protoespaceur (PAM)-domaines en interaction (rose). Les régions de cpf1 en dehors du domaine de type RuvC sont fonctionnellement non caractérisées et sont montrées en gris, tout comme le gène fonctionnellement non caractérisée all1473 dans le sous-type III-D.

### III. Rôle immunitaire du système CRISPR-Cas

En 2005, on observe que les séquences de certains spacers sont identiques à celles de certains éléments génétiques mobiles, notamment de virus et de plasmides (41,42,43).

En mars 2007, l'équipe de Philippe Horvath a montré que l'exposition de cellules porteuses de CRISPR à des phages entraîne l'apparition de nouveaux intervalles, que ces intervalles dérivent du matériel génomique des phages et

que le retrait ou l'ajout de ces intervalles modifie la résistance des bactéries face aux phages(44).

Le système CRISPR-Cas (CASS) est un mécanisme de défense contre les phages et plasmides invasifs, fonctionnant d'une manière analogue à celle du système ARNi des eucaryotes. En intégrant des fragments de gènes étrangers dans des parties non-codantes de leurs chromosomes, archées ou bactéries acquièrent une résistance aux phages et plasmides. Il s'agit donc d'une forme de système immunitaire héritable par transmission aux cellules filles, permettant aux archées et aux bactéries de s'adapter rapidement à l'évolution des phages et des plasmides (39,41,42,45).

En 2020, une étude explicite comment des marqueurs dérivés des génomes des différents virus rencontrés s'accumulent d'une manière chronologiquement ordonnée (à la manière d'un « enregistreur ADN ») dans la région CRISPR de leur génome(46). C'est la phase d'immunisation. S'ensuit une immunité : les protéines Cas utilisent ces informations pour reconnaître et désactiver tout virus de signature déjà connue(47).

Il a été montré que les phages pouvaient contourner le système CRISPR-Cas via des gènes spécifiques(48).

Les systèmes CRISPR-Cas observés chez les bactéries et les archées d'une part et le système ARNi observé chez les eucaryotes d'autre part ne semblent pas dériver d'un ancêtre commun. Ils ne sont donc pas homologues.

Les systèmes CRISPR-Cas peuvent fournir une défense robuste contre l'infection virale; cependant, les phages ont de multiples mécanismes pour éviter ces mécanismes immunitaires. L'évolution rapide des phages peut rendre obsolète une séquence d'espacement au fil du temps, d'autant plus que des particules virales abritant des mutations d'échappement se propagent dans la population (49,50,51). En effet, l'immunité CRISPR s'est révélée être un

facteur clé de l'évolution des phages (52,53). L'adaptation amorcée permet aux systèmes CRISPR-Cas de type I de contrer les événements d'évasion (54), grâce à l'acquisition rapide de nouvelles entretoises dirigées contre l'envahisseur. De plus, la diversité des séquences d'espacement au sein d'une population de bactéries peut limiter la capacité des phages à échapper à l'immunité CRISPR par le développement de mutations ponctuelles uniques (51).

Par conséquent, les phages ont développé des méthodes plus sophistiquées pour surmonter l'immunité CRISPR. Les protéines anti-CRISPR codées en phages peuvent inactiver la machinerie CRISPR-Cas grâce à une variété de mécanismes, neutralisant la réponse de l'hôte et permettant une infection continue (55,56).

### **IV. Application :**

CRISPR peut être un outil très utile pour modifier les gènes et traiter potentiellement des maladies complexes. Cependant, il doit encore être affiné comme une technique. Cela a incité les chercheurs à chercher des améliorations dans ce domaine, afin de rendre le processus plus précis et plus efficace.

Ces études récentes démontrent que des améliorations sont possibles et servent à mettre en évidence l'énorme potentiel qu'offre CRISPR.

Selon les chercheurs, les technologies CRISPR ont progressé et continueront de s'améliorer. Ils conviennent tous que CRISPR pourrait un jour être un moyen efficace de traiter les maladies génétiques.

La technique CRISPR-Cas est promise à de multiples évolutions / adaptations, ce qui laisse entrevoir une multiplicité d'applications.

### - **1er exemple** : [CRISPR-Cas9 / cytidine désaminase]

Un système a été développé dans lequel la fusion [CRISPR-Cas9 / cytidine désaminase] conserve la capacité d'être dirigé par un ARN guide, n'induit pas de cassure double brin de l'ADN et convertit directement une cytidine en uridine (substitution C -> T ou G -> A) dans une fenêtre d'environ cinq nucléotides.(57)

### - **2ème exemple** : dCas9 = end-nucléase Cas9 désactivée

dCas9 de *S. pyogenes* est une forme enzymatiquement inactive de Cas9. dCas9 ne peut donc pas hydrolyser l'ADN cible mais elle est toujours capable de le reconnaître et de le fixer par le biais de l'ARN guide et du motif PAM.

#### **Applications dCas9 :**

- régulation de la transcription de gènes guidée par un ARN (répression par interférence CRISPR ou activation par activation CRISPR). La fixation de dCas9 en aval du site de début de la transcription peut arrêter l'allongement de la transcription en bloquant l'ARN polymérase II ou en empêchant la fixation de facteurs de transcription.

- épigénétique

- contrôle de la transcription par fusion de dCas9 avec une protéine activable par certaines longueurs d'onde (optogénétique)

- cibler les ARN dans les cellules vivantes en fusionnant dCas9 à une protéine fluorescente. Les ARN ciblés fluorescents sont suivis dans la cellule, sans entraver leur mouvement ou leur fonction. (58)

### - **3ème exemple** : le système de type V CRISPR-Cpf1

Cpf1 : CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1 - nucléase d'environ 1300 acides aminés.

- Acronymes : LbCpf1 : Lachnospiraceae sp. / AsCpf1 : Acidaminococcus sp. / FnCpf1 : Francisella novicida U112
- Cpf1 et Cas9 diffèrent du point de vue structural : Cpf1 contient deux domaines nucléase "RuvC-like" éloignés sur le plan structural du domaine RuvC de Cas9. De plus Cpf1 ne possède pas de domaine endonucléase HNH. Cpf1 pourrait donc hydrolyser les deux brins d'ADN en formant un dimère.
- Cpf1 fonctionne aussi comme une RNase pour maturer le pre-crRNA (acides aminés His843, His852 et Lys869).
- Il n'y a pas de tracrRNA à proximité de la matrice CRISPR.
- un crRNA de 42 - 44 nucléotides avec une séquence répétée directe d'environ 19 nucléotides suivie d'une séquence espaceur de 23 - 25 nucléotides est suffisante pour guider l'endonucléase Cpf1 vers l'ADN cible.
- le motif PAM pour Cpf1 est 5'-TT(T)N-3'. (59)

- **4ème exemple** : recherche de paires de médicament anticancéreux

Les tumeurs deviennent souvent résistantes aux médicaments individuels. En revanche certaines combinaisons de médicaments peuvent détruire ces tumeurs résistantes.

Une méthode qui inactive systématiquement 2 gènes en même temps dans les cellules permet de chercher de telles combinaisons. Cette méthode est basée sur le système d'édition de gènes CRISPR-Cas9 (« CRISPR-based double knockout »).

- Des pools d'oligonucléotides ont été clonés séparément dans des vecteurs lentiviraux avec des promoteurs U6 humains (hU6) ou U6 de souris (mU6) pour générer 2 banques de sgRNA uniques.
- Puis 490,000 double sgRNAs (700 sgRNAs hU6 x 700 sgRNAs mU6) dirigés contre 21.321 paires de cibles potentielles de médicaments dans des cellules atteintes de leucémie (cellules K562) ont été étudiés pour rechercher des paires de médicaments qui fonctionnent de manière synergique.

L'inactivation de 2 gènes (BCL2L1 et MCL1) détruit les cellules résistantes : les médicaments qui inhibent les protéines codées par ces gènes détruisent plus de cellules leucémiques que ne le font chacun des deux médicaments séparément. (60)



**Chapitre III :**  
**Méthodologie de travail**

Chapitre III : Méthodologie de travail

I Matérielle et méthodes :

1. Séquences génomiques et identification de CRISPR :

Au total, 13 séquences complètes de chromosomes de Klebsiella ont été extraites de la base de données du génome du NCBI, dont 7 K. pneumoniae, 1 K. oxytoca, 1 K. variicola et 2 K. michiganensis (tableau 2).

Les locus CRISPR dans les génomes ont été identifiés par CRISPRFinder avec les arguments par défaut (61). NCBI BLAST a été utilisé pour identifier le gène cas dans la séquence upstream and downstream du loci CRISPR. Et CRISPRminer collecter et étudier la connaissance des systèmes CRISPR-Cas.

2. Analyse bio-informatique :

2.1 l'obtention du fichier Fasta :

Tous les fichiers fasta ont été récupérer du sites NCBI, puis télécharger :

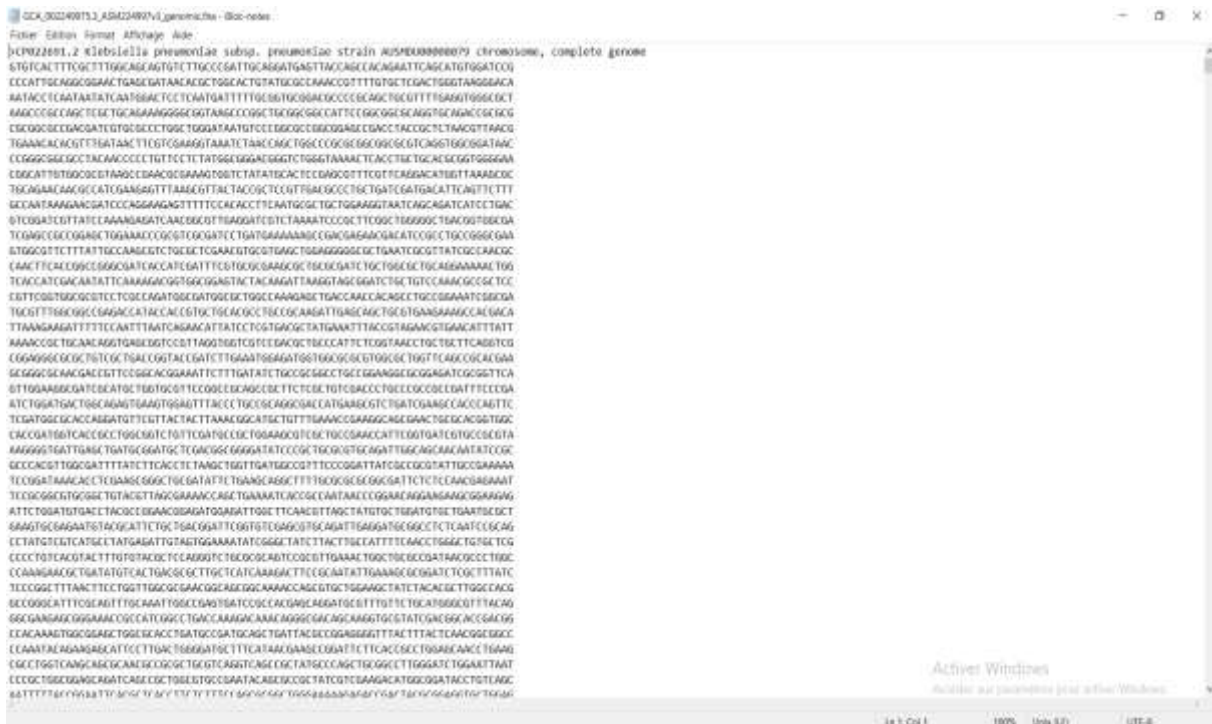


Figure N° 5. Représente un fichier fasta pour la 1<sup>er</sup> séquence.

## 2.2 L'identification par le CRISPRFinder :

Après l'obtention des fichiers fasta, on télécharge le fichier sur le site du programme pour lancer l'identification des DR & spacers (espaceurs) du CRISPR

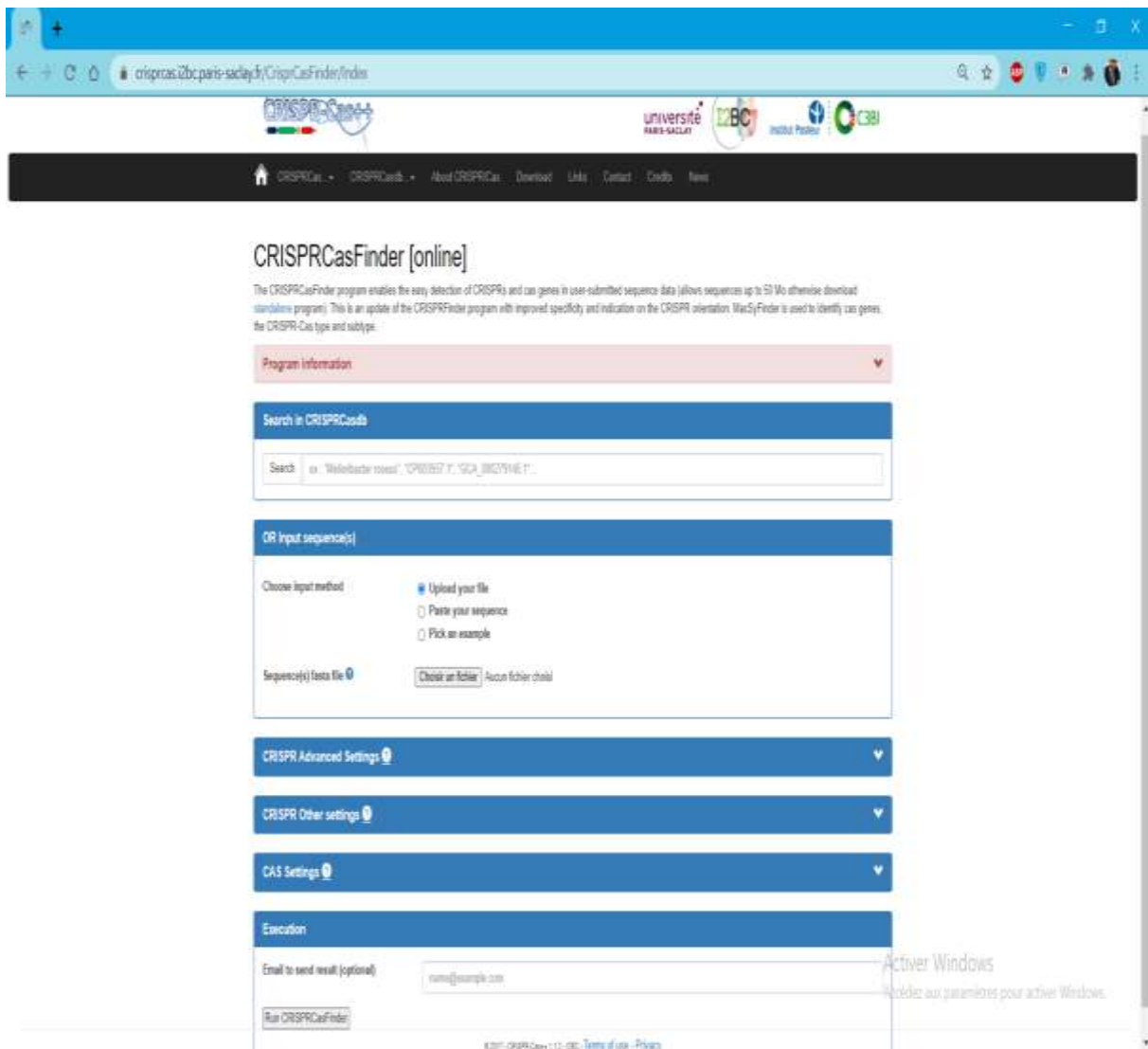
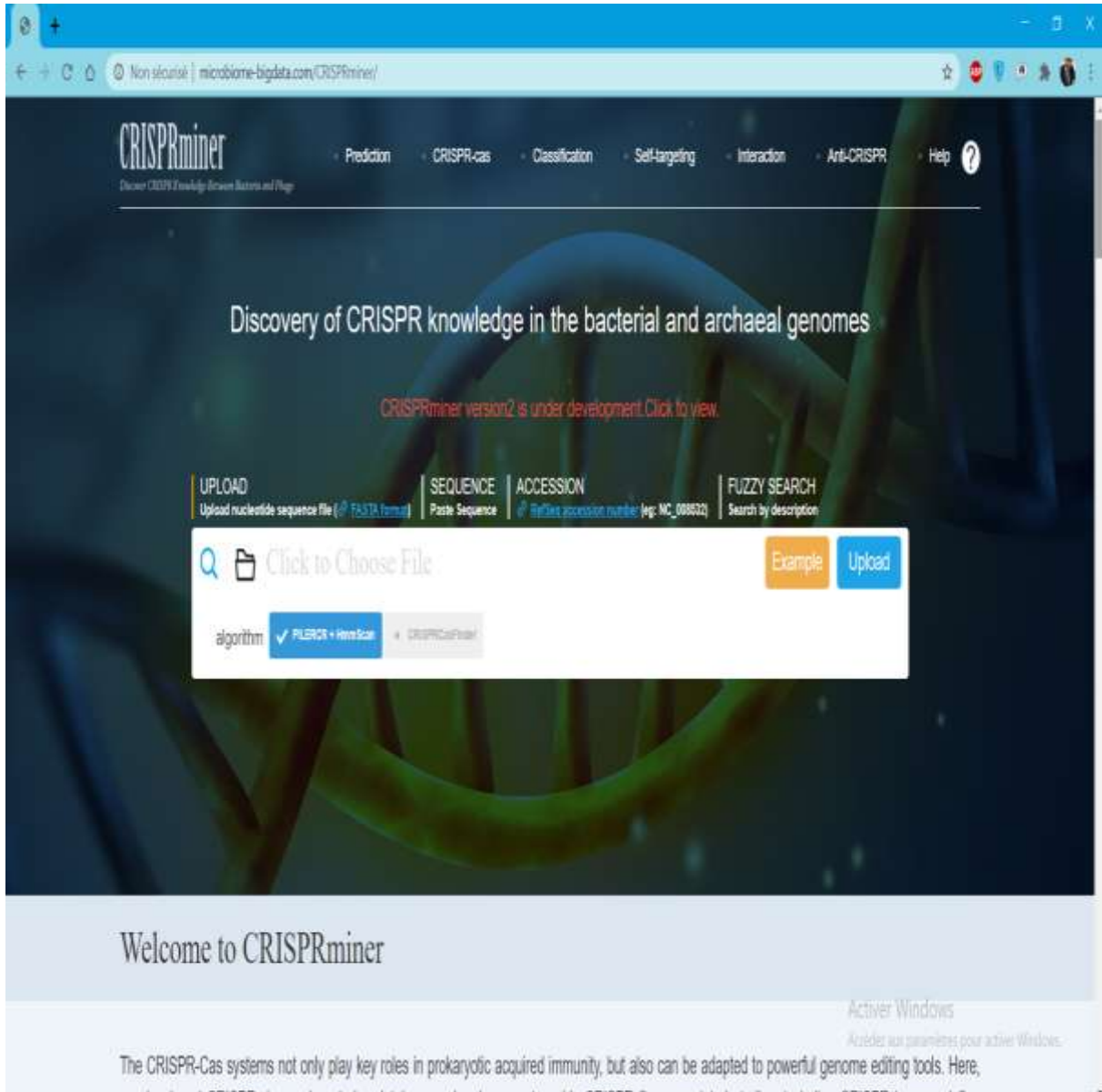


Figure N° 6. Représente le CRISPRFinder

### 2.3 Collecte de données sur CRISPRMiner :

Avec le fichier fasta, on le télécharge le fichier sur le site et on lance le programme pour l'obtention des informations sur le CRISPR locus, info sur des séquences des phages, Self-target.



**Figure N° 7.** Représente le CRISPRminer

## 2.4. L'identification du gène cas des séquences sur NCBI BLAST :

Après l'obtention des Séquences Spacers (espaceur), on blast, pour savoir la position des séquences qui peut être soit dans le chromosome ou le plasmide

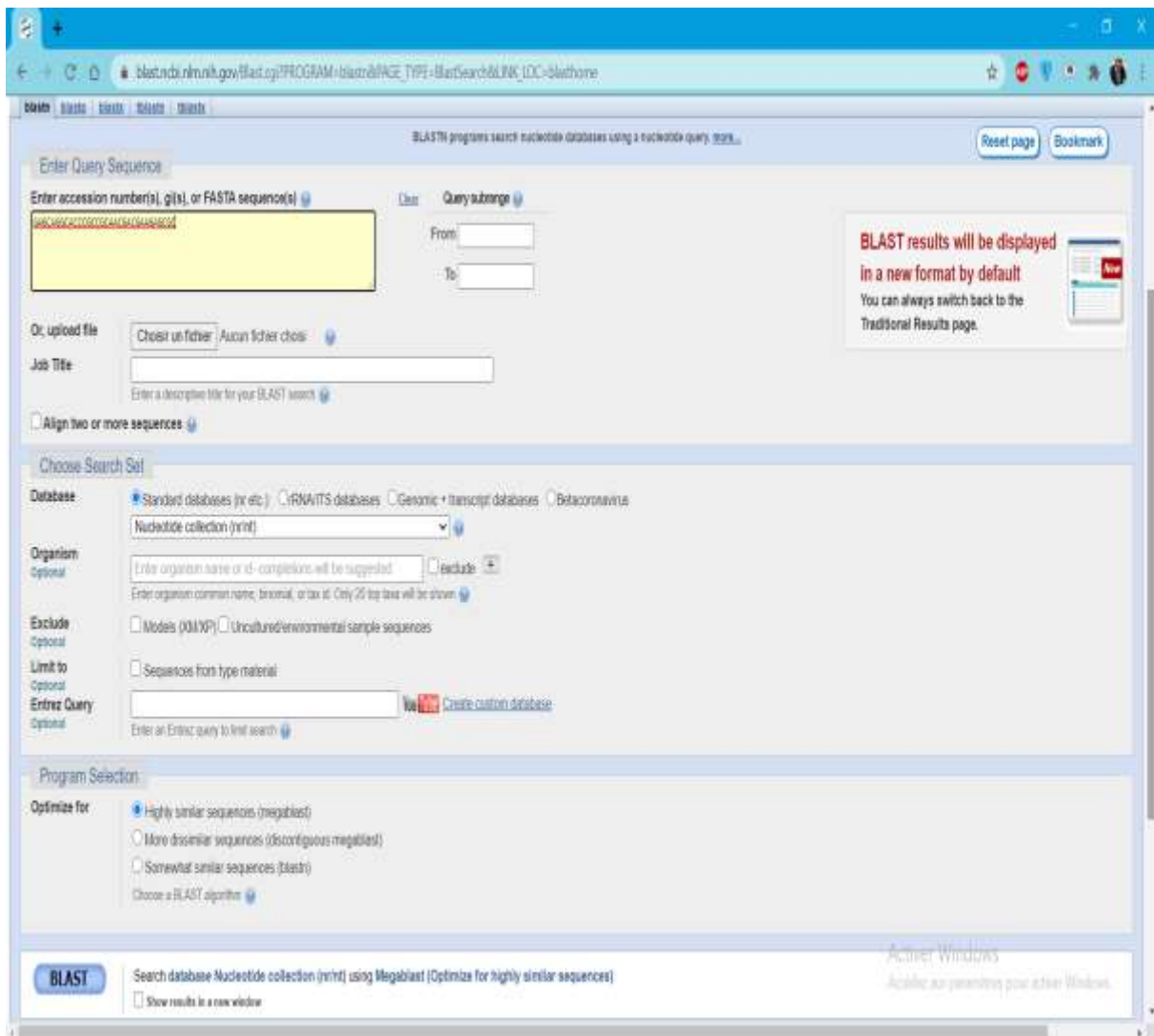
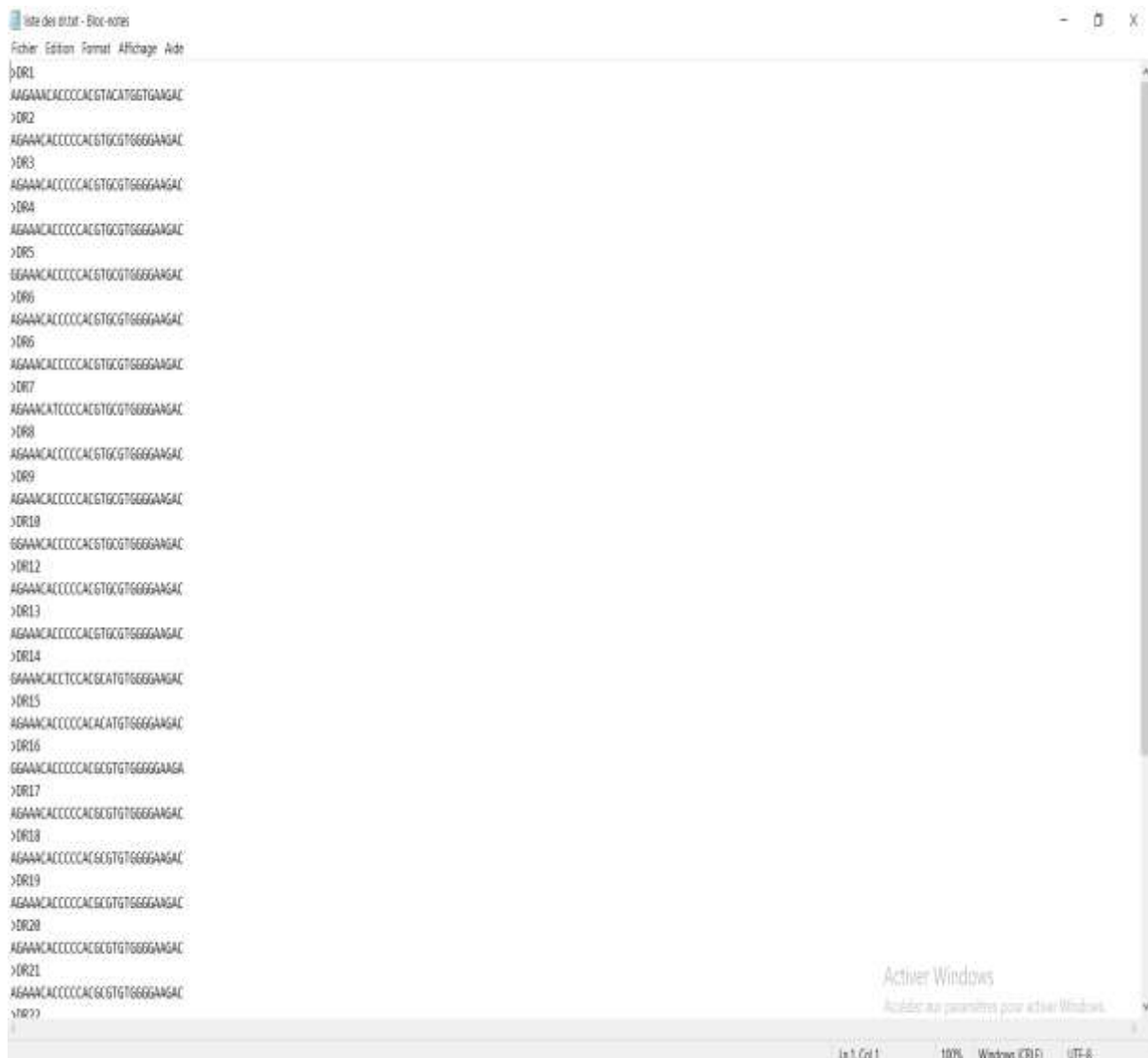


Figure N° 8. Représente le NCBI Blast

### 2.5. Alignement des DR's (séquences répétées) :

Après il faut faire une liste qui regroupe tous les DR de tous les séquences des souches en format fasta, on télécharge le fichier sur le site, dans le but de faire un Alignement des DR's

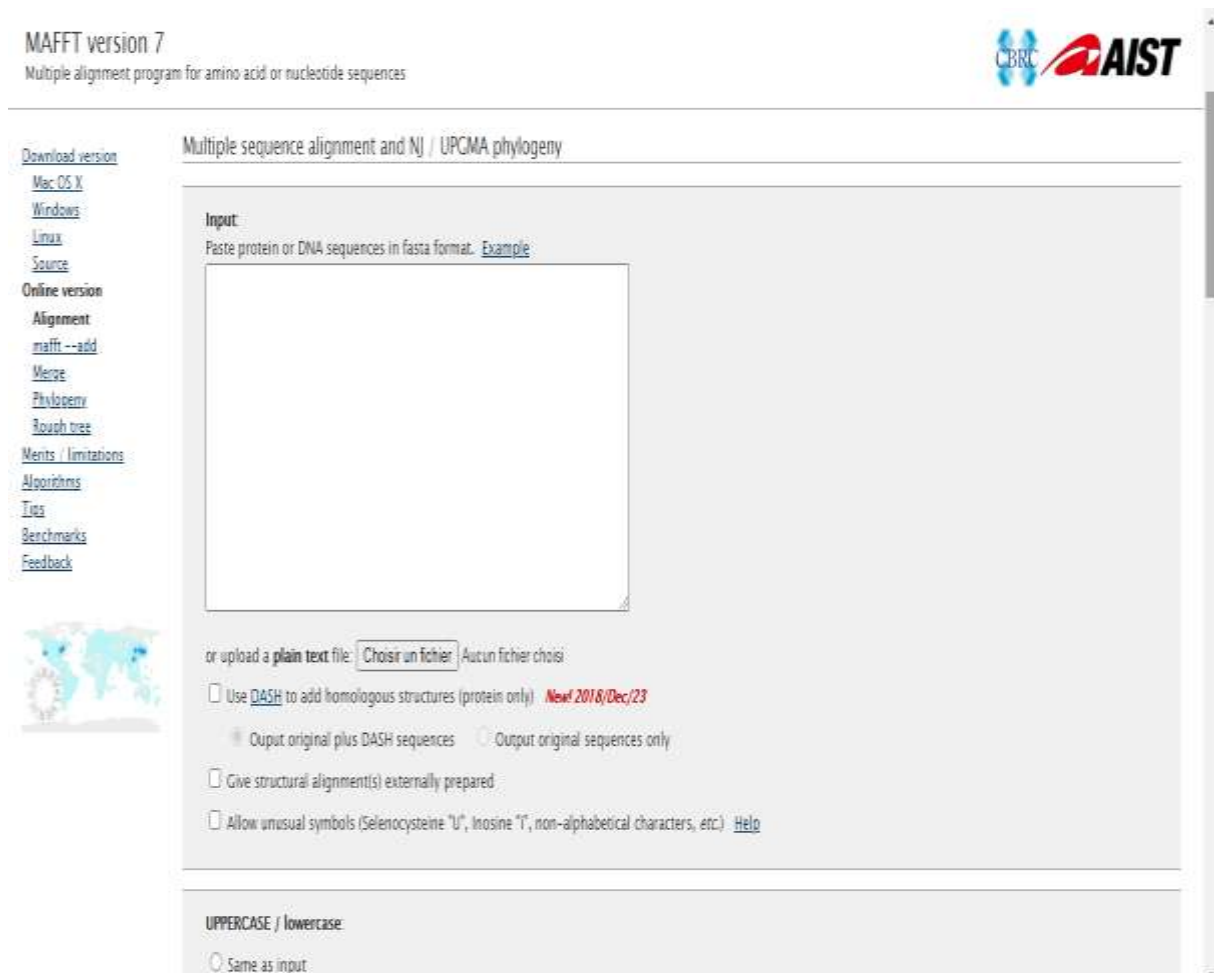


```
liste des dr.txt - Bloc-notes
Fichier Edition Format Affichage Aide
>DR1
AGAAACACCCCAAGTACATGTGGAGAC
>DR2
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR3
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR4
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR5
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR6
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR6
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR7
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR8
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR9
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR10
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR12
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR13
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR14
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR15
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR16
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR17
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR18
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR19
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR20
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR21
AGAAACACCCCAAGTGGTGGGAGAC
>DR22
```

Figure N° 9. Représente la liste de tout les DR

## 2.6. Création de l'alignement des DR's, un arbre phylogénétique :

Après l'obtention du résultat des alignements des séquences DR, qui ont été insérées dans le site : MAFFT (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences ) pour le but de faire des alignements, et l'arbre phylogénétique ; on enregistre le résultat sous format fasta,



MAFFT version 7  
Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences

CBRC AIIST

Download version  
Mac OS X  
Windows  
Linux  
Source

Online version  
Alignment  
mafft --add  
Merge  
Phylogeny  
Rough trees

Notes / limitations  
Algorithms  
Tips  
Benchmarks  
Feedback

Multiple sequence alignment and NJ / UPGMA phylogeny

Input:  
Paste protein or DNA sequences in fasta format. [Example](#)

or upload a plain text file:  Aucun fichier choisi

Use DASH to add homologous structures (protein only) **New! 2018/Dec/23**

Output original plus DASH sequences  Output original sequences only

Give structural alignment(s) externally prepared

Allow unusual symbols (Selenocysteine "U", Inosine "I", non-alphabetical characters, etc.) [Help](#)

UPPERCASE / lowercase:  
 Same as input

**Figure N° 10.** Représente le site : MAFFT (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences )

## 2.7. Utilisation d'approche et identification des MLST (Multilocus sequence typing) :

Le fichier fasta des séquences est téléchargé dans le software pour l'obtention des séquences et faire un repérage de polymorphisme.

**MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing)**

Software version: [2.0.4 \(2019-05-08\)](#)  
Database version: [2.0.0 \(2020-08-31\)](#)

Select MLST configuration

MLST allele sequence and profile data are obtained from [PubMLST.org](#).

Please note that for four organisms, two or three different MLST schemes are available:

- *Acinetobacter baumannii* (*Acinetobacter baumannii* #1 [1], *Acinetobacter baumannii* #2 [104]).
- *Escherichia coli* (*Escherichia coli* #1 [4], *Escherichia coli* #2 [5]).
- *Pasteurella multocida* (*Pasteurella multocida* #1 (R/RDC), *Pasteurella multocida* #2 (multihost)).
- *Leptospira* (*Leptospira* #1, *Leptospira* #2, *Leptospira* #3).

Select type of data input  
Only data from one single isolate should be uploaded. If raw sequencing reads are uploaded KMA will be used for mapping. KMA supports the following sequencing platforms: Illumina, Ion Torrent, Roche 454, SOLID, Oxford Nanopore, and PacBio.

Please note that "Assembled Genomes/Contigs" should be selected, if you have already assembled your short sequencing reads into one continuous genome or into several contigs. It is indifferent which type of short sequence reads were used to produce the genome/contigs.

Name	Size	Progress	Status

**Figure N° 11.** Représente le site MLST (Multilocus sequence typing) :

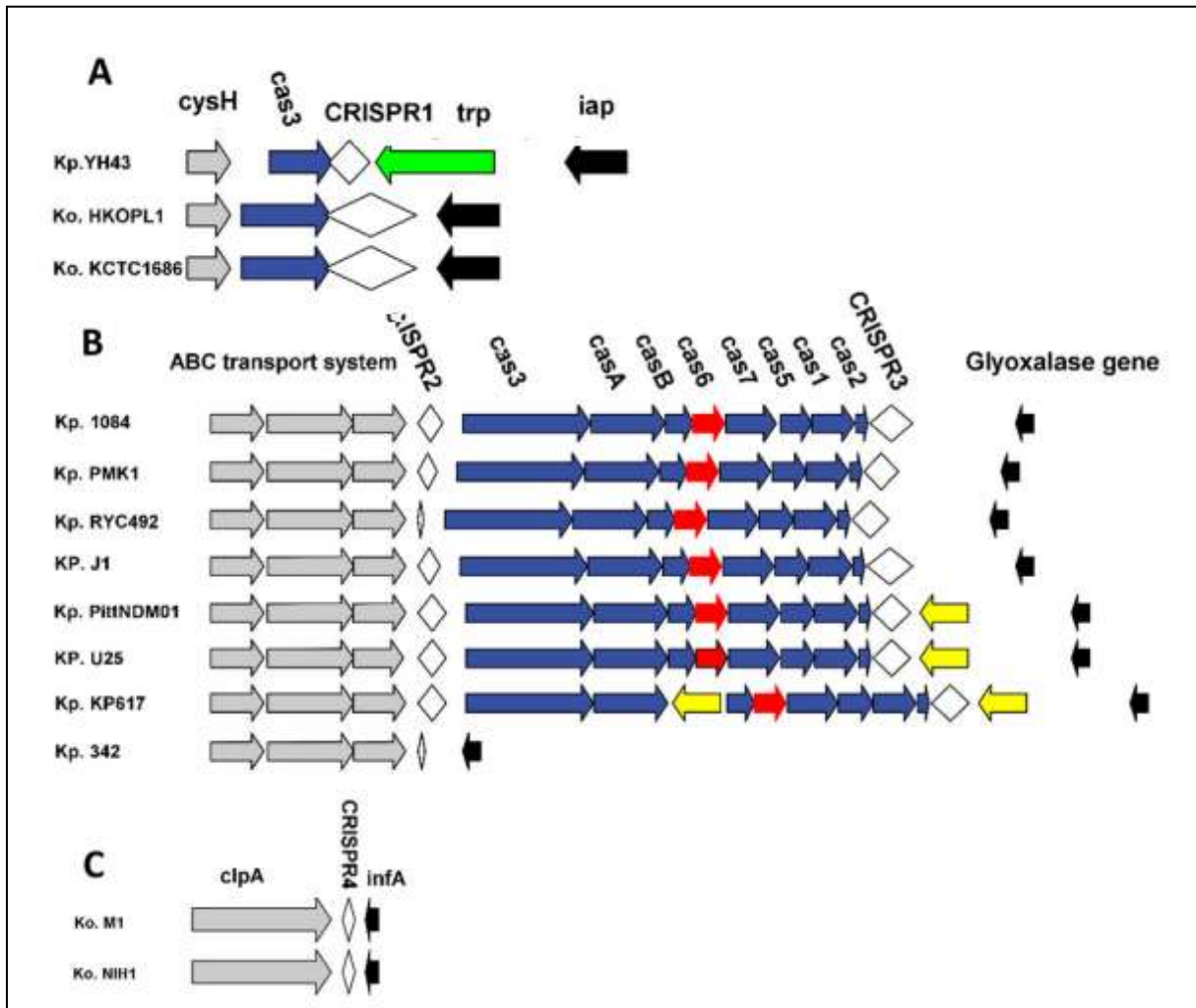
### 3. Discussion et résultat :

#### 3.1. Système CRISPR :

**Tableau 2 :** Les souches de *Klebsiella* Sp. et leur système CRISPR

Species	Accession number	CRISPR loci				Cas gene adjacent CRISPR	Collection location and date
		Start	End	Spacer number	Length of DR		
Kp. 1084	CP003785.1	2319792	2320306	8	28	8	China (2002-2004)
		2329062	2329943	14	29		
Kp. PMK1	CP008929.1	4766150	4766857	11	29	8	Nepal (2011)
		4775610	4776005	6	28		
Kp. RYC492	APGM01000001.1	2099167	2099286	1	28	8	Spain (before 1976)
		2108068	2108824	11	28		
Kp. PittNDM01	CP006798.1	1170138	1170905	12	29	8	USA (2013)
		1179658	1180236	9	29		
Kp. KP617	CP012753.1	554714	555292	9	28	8	Korea (2013)
		565245	566012	12	28		
Kp. J1	CP013711.1	5072070	5073012	15	28	8	China (2014)
		5081766	5082220	7	28		
Kp. U25	CP012043.1	3265852	3266619	12	29	8	India (2010)
		3275372	3275950	9	29		
Ko. KCTC 1686	CP003218.1	233753	235308	25	28	1	Korea
		3413123	3414831	28	29		
Ko. HKOPL1	CP004887.1	1829126	1830681	25	23	1	China
		4557589	4557671	1	29		
Kp. YH43	AP014950.1	1032023	1032722	11	31	1	Japan
Kp. 342	CP000964.1	2316593	2316745	2	28	0	Mexico (2000)
Ko. M1	CP008841.1	3054635	3054842	3	28	0	Korea (2012)
Ko. KONIH1	CP008788.1	2090479	2090686	3	28	0	USA (2012)

3.2. Architecture des loci et l'organisation du système CRISPR dans les gènes :

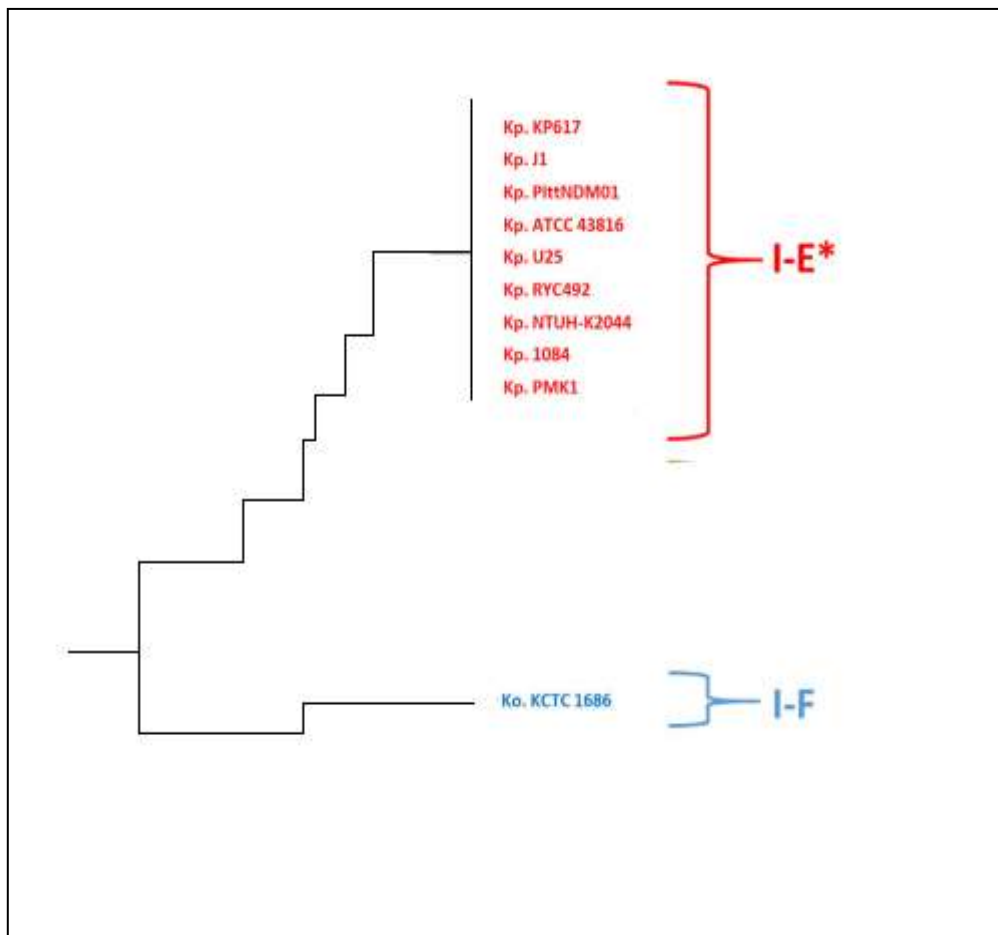


**Figure N° 12.** Architecture des loci et l'organisation du système CRISPR dans les gènes

Architecture des locus et organisation des gènes des systèmes CRISPR dans trois régions différentes dont la région *cysH-iap* (A, Type I-E), la région du gène du système de transport ABC-glyoxalase (B, Type I-E \*) et la région *clpA-infA* (C, Type I-F). Les diamants blancs représentent les loci CRISPR, et les flèches bleues représentent le gène *cas* à l'exception de *cas6* (flèches rouges). Les flèches grises et noires représentent les gènes en upstream et downstream des loci CRISPR, respectivement. Les flèches jaunes représentent les transpositions, Le groupe de gènes

cas dans la souche de *Ko.* HKOPL1 n'a pas le gène *cas1*. Les flèches vertes représentent le gène codant pour une protéine de répétition tétratricopeptide.

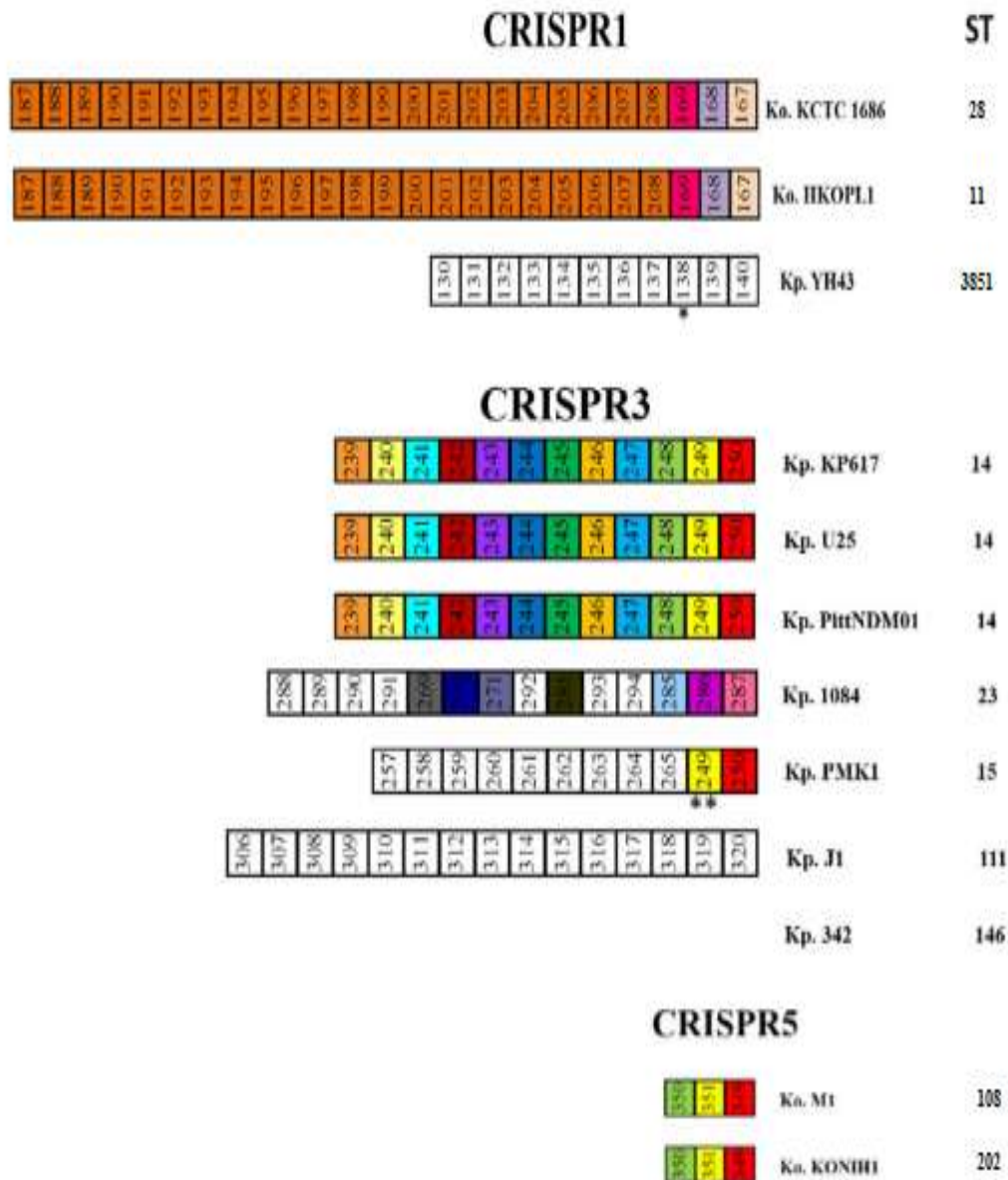
### 3.3. Arbre phylogénétique :



**Figure N° 13.** Arbre phylogénétique des protéines Cas1 chez Klebsiella.

Elle a été générée à l'aide de l'algorithme. Les protéines Cas1 représentatives ont été choisies parmi les six principaux sous-types du système CRISPR-Cas de type I (I-A à I-F)

3.4. Représentation du MLST et polymorphisme :

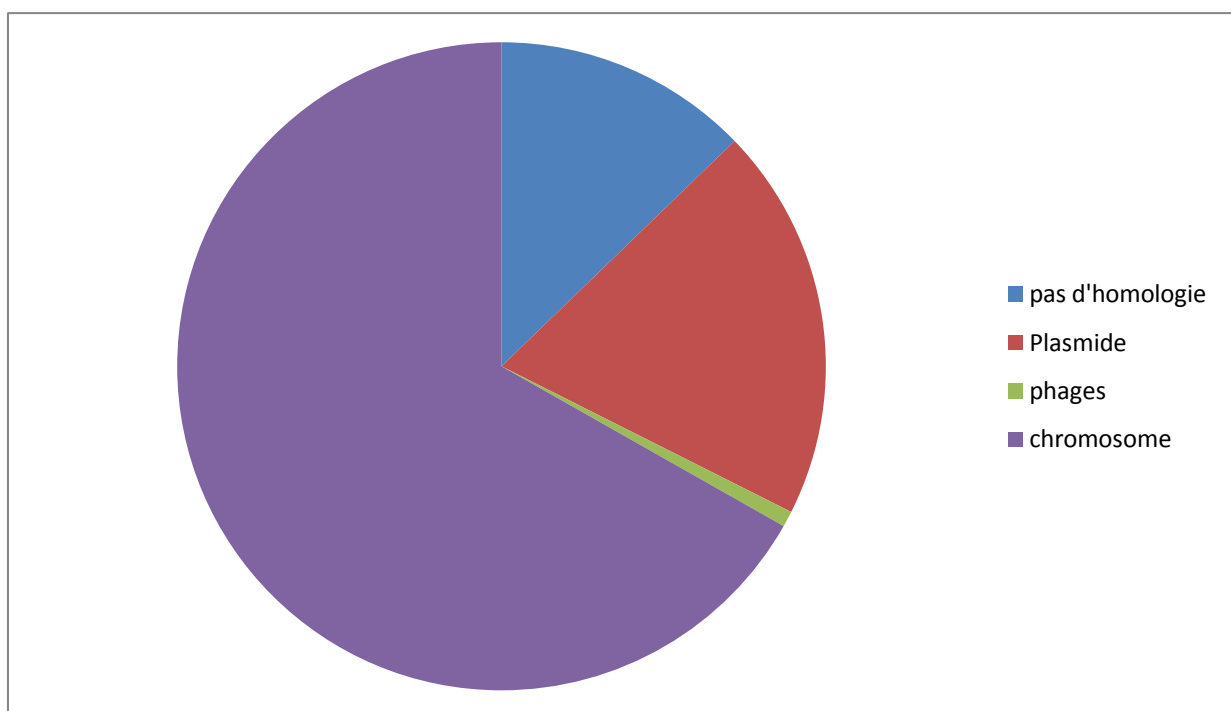


**Figure N° 14.** Représentation du MLST et polymorphisme : Polymorphisme CRISPR et sa relation avec les types de séquence multilocus (MLST). Les espaceurs (spacers) sont représentés par des cases; les répétitions ne sont pas incluses. Le même numéro et la même couleur représentent un espaceur identique. La couleur blanche

représente un espaceur unique. Les espaceurs auto-ciblés sont indiqués par des points le bas de l'espaceur, et deux points signifient un espaceur qui correspondait parfaitement.

La MLST de *Klebsiella pneumoniae* a été réalisée sur la base de données PubMLST. Le type de séquence (ST) est étiqueté à droite

### 3.5. L'origine et distribution du CRISPR :



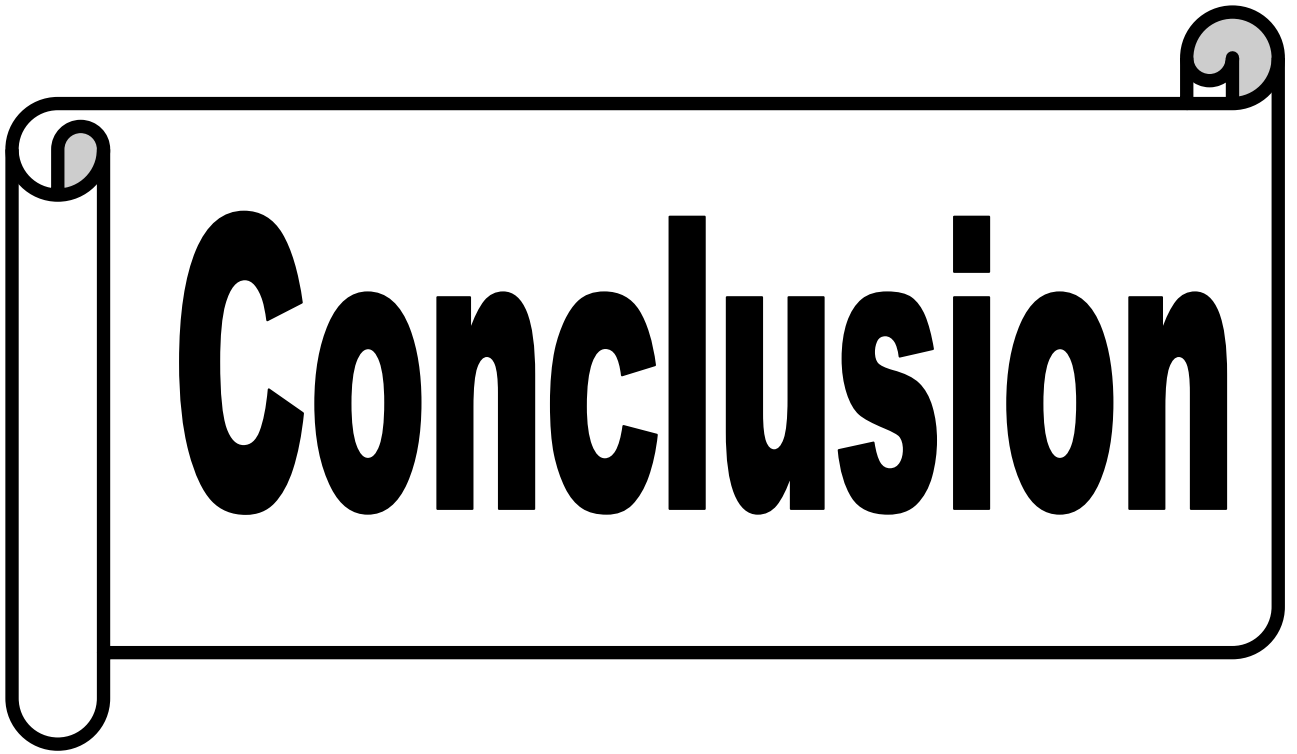
**Figure N° 15.** Représente La distribution des espaceurs CRISPR dans les plasmides, les phages et les chromosomes on été déterminée par identité de séquence. Tous les espaceurs ont été dynamités contre la base de données GenBank pour trouver une séquence.

### 4. Interprétation :

Tout d'abord, nouvelle forme d'arrangement des gènes cas (appelé Type I-E\*) trouvé. Bien que selon la méthode actuelle de classification cela devrait toujours être un Type I-E CRISPRCas le système comme aucun

gène cas distinct n'a été trouvé au-delà. Mais la présente étude a indiqué qu'ils sont différents dans beaucoup d'aspects : le différent arrangement de gènes cas (la Figure 12), les similarités basses de protéines Cas (la Figure 14 et la Table 2);

MLST est une séquence nucléotidique basée sur une méthode de typage utilisée pour *K. pneumoniae*. Par combinant l'analyse du polymorphisme CRISPR et MLST, une forte corrélation a été observée. Dans lequel, tous les souches avec des tableaux CRISPR identiques appartiennent à la même ST. qui indiquent la spécificité différente au cours de la phase d'adaptation. Cependant, dans *Klebsiella*, le CRISPR3 semble être plus actif que le CRISPR2, qui est différent de celui du type I-E CRISPR d'*Escherichia*. Les espaceurs CRISPR ciblant principalement des éléments mobiles ont indiqué que le système a été impliqué dans la régulation de HGT (Transfert horizontal de gènes). L'incidence élevée d'espaceurs à auto-ciblage indique que le système CRISPR-Cas a d'autres fonctions que l'immunité adaptative.(62)



**Conclusion**

## Conclusion

---

### Conclusion :

- Le but de cette étude était de comparer les différents systèmes CRISPR-cas chez les *Klebsiella* Sp., à savoir : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, et *K. michiganensis*, l'étude visait à fournir une séquence approfondie analyse du système CRISPR-Cas à *Klebsiella*. Certains des différences importantes ont été constatées par rapport à d'autres pathogènes de la famille des Enterobacteriaceae. Les systèmes de type I-E et I-F d'entérobactéries et d'autres protéobactéries ont servi de systèmes modèles importants pour comprendre les mécanismes moléculaires des systèmes CRISPR-Cas. Les études sur *Klebsiella* ont fourni la base de nos connaissances sur les systèmes CRISPR-Cas de type I et ont révélé plusieurs similitudes et différences clés entre les sous-types. À l'avenir, ces organismes modèles continueront d'être indispensables pour répondre aux questions mécanistes qui restent sans réponse. Ils seront également essentiels pour résoudre un mystère de longue date dans le domaine: quel est le rôle endogène des systèmes CRISPR-Cas des entérobactéries les plus étudiées, *E. coli* et *Salmonella*? Au-delà des études mécanistes, comprendre comment et dans quelles circonstances ces systèmes fonctionnent, peut révéler de nouveaux rôles pour les systèmes CRISPR-Cas au-delà de la défense de l'hôte.

A la fin de ce modeste travail, nous espérons que la recherche et les études continueront dans les buts d'améliorer la découverte de ces systèmes, dont on ignorait totalement l'existence, est le résultat d'une recherche non guidée par l'hypothèse et rendue possible par la curiosité de chercheurs face à un élément biologique nouveau. Ces nouveaux naturalistes utilisent la bio-informatique pour puiser dans les données de génomique microbienne à la découverte d'espèces et de fonctions biologiques insoupçonnées.



# Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques :

1. Methods Mol Biol. 2015 ; 1311: 47–75. doi:10.1007/978-1-4939-2687-9\_4.
2. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 2007;315:1709-12.
3. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC Bioinformatics 2007;8:172.
4. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 2015;13:722-36.
5. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 2011;9:467-77.
6. Pul U, Wurm R, Arslan Z, Geissen R. Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. Mol Microbiol 2010;75:1495-512.
7. Patricia A. Bradford. Extended-Spectrum beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Résistant Threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):933-51.
8. Mereym Berrazg, Seydina M. Dienne, Mourad Drissi, Marie Kempf, Hervé Richet, Luce Landraud, et al. Biotyping of Mullidrug Resistan Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDITOF MS. avr 2013;8.
8. Stenn G. Stahlhut, Carsten Struve, Karen A. Krogfelt, Andreas Resneir. Biofilm formation of Klebsiella pneumoniae on urethral catheters requiers either type 1 or type 3 fimbriae. 23 April 2012. 14 oct 2011;351.
10. Nedjai S, Baguegua A, Djahmi N, jamali L, Zerouali K. Prevalance and characterization of exteaded specrum-lactamase in Klebsiella- Enterobacter-Seratia group bacteria? in algeria. Medecine et maladies infectieuses 42. 2012. 2011;20-9.

## Références bibliographiques

---

11. Wenzhi BI, Haiyang Liu, Rhys A. Dunstan, Bin Li, Von Vergel L T, Jianming Cao, et al. Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Causing Nosocomial Bloodstream Infections in China: Informing Therapy, and clinical Outcomes. 30 juin 2017;2.
12. Avril J-L, H. D, F. D, H. M. BACTERIOLOGIE CLINIQUE. 3 ellipses. Paris cedex 15; 2000. 171-173-210 p.
13. Fauchère J. L, Avril J. L. Bactériologie générale et médicale. 15e éd. 2002. 252-365 p.
14. Freney J, Girardo P, Freydière AM, Renaud FNR. Enterobacteries. 2008. 90-5-135 p.
15. Ferron A. Bactériologie médicale. 15 eme C et R. 157-163 p.
16. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae : introduction and identification Dans Manual of clinical microbiology. Patrick R. Murray. 9ème. 2007. 649-66 p.
17. Bonnet R. Beta-lactamine et Enterobacterie Dans: Antibiogramme. 3 eme ESKA. Pais; 2012. 165-88 p.
18. Freney J, Croze M. Enterobacteriaceae-généralité Dans: Précis de bactériologie clinique. 2 eme ESKA. Paris; 2007. 979-87 p.
19. Bimet F. Conservation des bactéries In: Précis de bactériologie clinique. 2 ed ESKA. Paris; 2007. 729-33 p.
20. DUCA E, DUCA M, FURTUNESCU G. Microbiologie médicale. Didactique et pédagogique. Bucarest. 2e éd. 1979. 436 p.
21. Gorge M Garrity, Julia A Bell, Timothy G Lilburn. Taxonomic outline of the Prokaryote. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. second. 2004.
22. Sharon L L, Abbott. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other Enterobacteriaceae. Dans: manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 9e éd. Vol. 1. 2007. 698-706 p.

## Références bibliographiques

---

23. Joly B, Reynaud A. Enterobacterie. Systematique et méthode de diagnostic. 2002. 79 80 83.
24. Richard CL, Grimont F. Klebsiella, Enterobacter, Hafinia, Serratia. In: LE MINOR(L). Bactériologie médicale. Flammarion. Paris; 1992. 427-31 p.
25. Boukadida J, Salem N, Hannachi N, Monastiri K, Snonssi N. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à Klebsiella pneumoniae productrice de beta-lactamase à spectre étendu. 2002;463-8.
26. R. Podschun, U. Ullmann. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. oct 1998;4(11):589-98.
27. Michel Drancourt. KLEBSIELLA in: Précis de Bactériologie Clinique. Editions ESKA. 2000. 1172 p.
28. MICHEAL J S, PAUL E S, BURKE A C. Cerebral Abscess caused by Klebsiella ozaenae. 1987;25(8):1553-4.
29. Botelho-Nevers E, Gouriet F, Lipidi H, Couvret A, Amphoux B, Dessi P, et al. Chronic nasal infection caused by Klebsiella rhinoscleromatis or Klebsiella ozaenae: two forgotten infectious diseases: International Journal of infectious diseases.
30. Janda, J.M., Abbott, S.L. The Genera Klebsiella and Raoultella. The Enterobacteria. 2nd ed. Washington; 2006. 115-119 p.
31. Hennequin C, Forestier C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamase encoding plasmids upon Klebsiella pneumoniae adhesion. Research in Microbiology 158. 2007. 339-347 p.
32. Carsten Struve, Martin Bojer, Karen Angeliki Krogfelt. Characterization of Klebsiella pneumoniae Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. sept 2008;76(9):4055-65.

## Références bibliographiques

---

33. Tricia A. Schurtz S, Timo K.Korhonen, Dougla B. Hornhick, Steven Clegg. Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of Klebsiella Strains. juin 1998;66(6):2887-994.
34. K. El Rhazi, S Elfahir, M. Berraho, N. Tachfouti, Z. Serhier. Prévalence et facteurs des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc). 2007;13(1):57.
35. Heberle-Bors, E. *Génie génétique: une histoire, un défi*. (Editions Quae, 2001).
36. Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
37. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
38. Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 560–564 (1977).
39. Mullis, K. B. Process for amplifying nucleic acid sequences. (1987).
40. CultureLab: Atomic gardening: Day of the irradiated peanuts. Available at: <https://www.newscientist.com/blogs/culturelab/2011/06/atomic-gardening-day-of-theirradiated-peanuts.html>. (Accessed: 27th November 2016)
41. Martine BUTREAU-LEMAIRE, Henry BOTTO. Infection urinaire nosocomiales. 1997;7:674\_682.
42. E. Lachassinne, E. Letamendia R, J. Gaudelus. Epidemiology of nosocomial infections in néonates. 2003;11:229-33.
43. Angel Asensio, Antonio Oliver, Paulino Gonzalez D, Fernando Baquero, Jose Claudio Pérez D, Purification Ros, et al. Outbeak of a Multiresistant Klebsiella pneumoniae Strain in an Intensive Care Unit: Antibiotic Use as Risk Factor for Colonization and Infection. 1 janv 2000;30:55-60.

## Références bibliographiques

---

44. Dalète Elhani, Laila Bakir, Mahjoub Aouni. Changement de l'épidémiology de *Klebsiella pneumoniae* productrices de beta-lactamases à spectre élargi. oct 2011;69(5):524.
45. [Komor et al. (2016)]
46. [Dominguez et al. (2016) - Nelles et al. (2016)]
47. [Sontheimer & Wolfe (2015) - Dong et al. (2016) - Fonfara et al. (2016) - Yamano et al. (2016)]
48. [Han et al. (2017)]
49. Ruud Jansen, Jan D. A. van Embden, Wim Gaastra et Leo M. Schouls, « Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes », *Molecular Microbiology*, vol. 43, n° 6, 2002, p. 1565-1557 PMID 11952905)
50. C. Pourcel, G. Salvignol et G. Vergnaud, « CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies », *Microbiology*, vol. 151, n° 3, mars 2005, p. 653-63 (PMID 15758212).
51. F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez et E. Soria, « Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements », *Journal of molecular evolution*, vol. 60, n° 2, février 2005, p. 174-82 (PMID 15791728)
52. A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin et S. D. Ehrlich, « Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin », *Microbiology*, vol. 151, n° 8, août 2005, p. 2551-61 (PMID 16079334)
53. Rodolphe Barrangou, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero et Philippe Horvath, « CRISPR provides acquired resistance against viruses in

## Références bibliographiques

---

- prokaryotes », *Science*, vol. 315, n° 5819, 23 mars 2007, p. 1709-1712 (PMID 17379808)
54. Julie E. Samson, Alfonso H. Magadán, Mourad Sabri et Sylvain Moineau, « Revenge of the phages: defeating bacterial defences », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, n° 10, 27 août 2013, p. 675-87 (PMID 23979432)
55. Sungchul Kim et al., Selective loading and processing of prespacers for precise CRISPR adaptation, 2020. DOI:10.1038/s41586-020-2018-1
56. *La Recherche*, avril 2020 p. 22
57. Joe Bondy-Denomy, April Pawluk, Karen L. Maxwell et Alan R. Davidson, « Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system », *Nature (revue)*, vol. 493, n° 7432, 17 janvier 2012, p. 429-32 (PMID 23242138)
58. Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B. & Koonin, E. V. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 482-496 (2002).
59. Brouns, S. J. J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960-964 (2008).
60. Schumann, K. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 10437-10442 (2015).
61. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC bioinformatics* 2007;8:172.
62. Shen J, Lv L, Wang X, Xiu Z, Chen G. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J Basic Microbiol.* 2017;9999:1-12.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.201600589>